



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

EFEITOS DO TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA
INTENSIDADE DE CURTO PRAZO SOBRE OS
BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO
E DANOS MUSCULARES EM RATOS

LÚCIO MARQUES VIEIRA SOUZA

SÃO CRISTOVÃO

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

EFEITOS DO TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA
INTENSIDADE DE CURTO PRAZO SOBRE OS
BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO
E DANOS MUSCULARES EM RATOS

LÚCIO MARQUES VIEIRA SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Educação Física da
Universidade Federal de Sergipe como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Silvan Silva de Araújo

SÃO CRISTOVÃO
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ- REITORIA DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

LÚCIO MARQUES VIEIRA SOUZA

EFEITOS DO TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE
DE CURTO PRAZO SOBRE OS BIOMARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO E DANOS MUSCULARES EM RATOS

São Cristóvão

2018

SOUZA/LÚCIO
MARQUES VIEIRA SOUZA

EFEITOS DO TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE
DE CURTO PRAZO SOBRE OS BIOMARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO E DANOS MUSCULARES EM RATOS

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S729e Souza, Lúcio Marques Vieira
Efeitos do treinamento intervalado de alta intensidade de curto prazo sobre os biomarcadores de estresse oxidativo e danos musculares em ratos / Lúcio Marques Vieira Souza ; orientador Silvan Silva de Araújo. – São Cristóvão, 2018.
85 f. : il.

Dissertação (mestrado em Educação Física) – Universidade Federal de Sergipe, 2018.

1. Educação física. 2. Extresse oxidativo. 3. Músculos. 4. Treinamento. I. Araújo, Silvan Silva de, orient. II. Título.

CDU 796:612.766.1

LÚCIO MARQUES VIEIRA SOUZA

EFEITOS DO TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA
INTENSIDADE DE CURTO PRAZO SOBRE OS
BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO
E DANOS MUSCULARES EM RATOS *WISTAR*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Educação Física da
Universidade Federal de Sergipe como
requisito para obtenção do grau de Mestre em
Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Silvan Silva de Araújo

APROVADO EM:___/___/___

Orientador: Prof. Dr. Silvan Silva de Araújo

1ºExaminador: Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal

2ºExaminador: Prof. Dr. Eduardo Seixas Prado

PARECER

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: os meus pais (Lucivaldo e Maria) minha esposa (Manuela) e ao meu filho (Caio Lucca)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por guiar os nossos passos.

Aos meus pais (Sr. Lucivaldo e D. Maria), que nunca mediram esforços para que eu tivesse a melhor formação educacional, por sempre apoiarem as minhas decisões independentemente se ficaria ainda mais distante. Enfim, amo vocês! Ao meu irmão (Lécio) por torcer por mim, meu obrigado.

À minha querida e amada esposa (Manuela “Bê”) e ao meu “filhote” (Caio Lucca – It’s my boy), por entenderem a minha ausência por alguns momentos e estarem sempre com um sorriso lindo e um abraço forte carinhoso para me darem, é por vocês todo o meu sacrifício e luta.

Aos amigos de trabalho da Escola Sagrada Família (Neópolis-SE) e em especial a Diretora Salete e a Coordenadora Débora, do DEF/SEED e em especial a Dorinha, Patrícia e Matias, obrigado por acreditaram no Professor de Educação Física!

Ao meu orientador Silvan, pela oportunidade em ingressar no meio científico, mas antes mesmo disso foi meu professor na graduação, professor e orientador na Especialização Lato Sensu, professor e orientador na pós-graduação, colega de trabalho na Secretaria de Estado da Educação de Sergipe – SEED/SE e na Faculdade Maurício de Nassau – Aracaju/SE, e além de tudo amigo e parceiro.

Ao professor Eduardo Seixas, por ser esse cara tão simples e humilde. Obrigado por ter feito parte do teu grupo de pesquisa, foi uma honra e um aprendizado enorme.

Aos professores Anderson Marçal e Charles Estevam, por todo apoio em paralelo no meu projeto e em minha vida acadêmica, e provando que áreas interdisciplinares podem atuar juntas e conseguirem ótimos frutos. Nossos caminhos irão continuar juntos por mais alguns longos anos.

Aos meus grandes colaboradores e amigos Jymmys Lopes e Roas Araújo por todos os ensinamentos e disposição para ajudar, além de partes fundamentais para o desenvolvimento deste estudo. A Samuel (Samuelzinho) e Samuel Bruno pela amizade e ótimos momentos juntos.

A professora Sandra Lauton e aos amigos do Laboratório de Estresse Cardiovascular e em especial a Rodrigo e Laíza, por dividirem e permitirem o uso de um espaço com vocês, por toda disposição em ajudar e fazer isto acontecer.

A todos os amigos do Laboratório de Bioquímica de Produtos Naturais (Clésio, Andréa, Sabrina, Marcel, Mateus, Ariel, entre tantos) por me receberam de braços abertos e aceitarem que por várias vezes eu dividisse um espaço na bancada de vocês.

Ao grupo GEPBFEX (Waleska, Max, Vitor, Sidnei) sintam-se parte deste momento.

A minha super equipe “Girls Toppers Superpoderosas”, Anne (docinho), Bruna (lindinha) e Layane (florzinha), por toda amizade e pelo trabalho em conjunto.

Ao professor Fabrício Voltarelli e o seu fantástico grupo. Vocês são exemplos e referências.

Ao professor Marzo, Coordenador da Pós-Graduação em Educação Física, e a todos os professores (Roberto Jerônimo [“xefe” obrigado por tudo, pela amizade, conselhos e ensinamentos, você é o cara!], Felipe Aidar [“Felipão” o teu coração é do seu tamanho, rsrs], Marcos Bezerra [grande parceiro de debates e café original e sem açúcar], Rogério Wichi [“baixinho” mas com uma inteligência e capacidade sem tamanho], Afrânio Bastos [sensatez, paciência e amizade são suas características], Walderi Monteiro [simplicidade e grande capacidade], Raquel Cortes [a “dona” da Nutrição na UFS, rsrs], Aldemir Smith [professor e amigo desde os tempos da graduação]), pelos momentos reflexivos durante as reuniões da equipe colegiada em prol de uma Pós-Graduação de qualidade e uma Educação Física ainda mais reconhecida pelos resultados da produção científica. Além, de Sandriele a nossa mais que eficiente Secretária do PPGEF/UFS.

Aos professores do Departamento de Educação Física, em nome de Pedro Jorge, Ailton e Danilo, pelas excelentes conversas durante os almoços.

E claro não poderia esquecer da melhor turma de mestrado do mundo, Família Mestrado 2016.1 vocês são demais! Foram momentos de muitas alegrias e aprendizados, deixo aqui em nome da turma os meus sinceros agradecimentos e carinho para Lucas (meu parceiro), Rural (vulgo “José Carlos”), Hortência (a nossa “doutora”, e nunca esquecerei das suas caronas e jeito simples de ser), Thaysa (sou fã mesmo), Andressa (galega), Gracielle (minha parceira do Futsal), e todos (Tiago [o “diferenciado”], Edson “o Gomes” Patrícia, Marcell, Marta, Nando Jet Lee, Daiane, Débora, Akeline, Davi, Dilton [“di boinha”], as Jamilles, Madson [meu bhodher], Mona, Mônica, Kênia, Larissa, Ana Cláudia e Thiago Dantas) aprendi muito com vocês!

Aos meus colaboradores diretos e indiretos meu muito obrigado!!!

“O que fazemos na vida, ecoa pela eternidade!”

(Gerenal Maximus, do Filme: O Gladiador, 2000)

RESUMO

O treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) na comunidade científica tem se tornado muito notório em função da divulgação de estudos experimentais. O HIIT promove adaptações semelhantes aos exercícios de longa duração e baixa intensidade, tais como melhora da capacidade cardiorrespiratória, do metabolismo de repouso, aumento da ventilação pulmonar, entre outros. Porém, estas adaptações são obtidas com duração muito inferior em intensidades máximas ou submáximas, com segundos ou poucos minutos de intervalo. Contudo, a frequente realização pode aumentar a suscetibilidade a lesões, promover a fadiga crônica e overtraining, parcialmente em razão da elevada síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre as reações de oxidação e de antioxição. Entretanto, ainda existem lacunas a serem preenchidas acerca dos efeitos do HIIT sobre o estado oxidativo e danos musculares, sobretudo em modelo animal. O objetivo desta dissertação foi verificar os efeitos do HIIT de curto prazo sobre os biomarcadores de estresse oxidativo e danos musculares em ratos. Desta forma, foram elaborados três estudos: 1. Avaliou-se os efeitos do HIIT de curto prazo sobre os marcadores de estresse oxidativo e danos musculares; 2. Buscou-se caracterizar as respostas dos marcadores de estresse oxidativo cardíaco ao HIIT em ratos. 3. Verificou-se os efeitos de doze sessões consecutivas e em dias distintos de HIIT sobre os marcadores de estresse oxidativo hepático. Nos estudos 1 e 2 foram encontradas alterações significativas em apenas um marcador de dano oxidativo, fato este que não aconteceu no estudo 3. Ainda sobre o estudo 1 não houveram alterações nos marcadores de danos musculares, no entanto houve uma redução significativa num marcador de defesa antioxidante. Nos estudos 2 e 3 não houveram mudanças significativas na capacidade antioxidante. Conclui-se que o HIIT, seja realizado em dias consecutivos ou distintos, e a depender do tecido pode ou não promover danos hepáticos, cardíacos e musculares em ratos.

Palavras-chave: Treinamento intervalado de alta intensidade; Estresse oxidativo; Danos musculares.

ABSTRACT

High intensity interval training (HIIT) has become very popular due to the dissemination of experimental results. HIIT promotes similar adaptations to long-term and low-intensity exercises, such as improvement in cardiorespiratory capacity, VO₂max, respiratory metabolism, increased pulmonary ventilation, among others. However, these adaptations are obtained with much lower duration at maximum or submaximal intensities, with seconds or few minutes of interval. However, frequent performance may increase susceptibility to injury, promote chronic fatigue and overtraining, partly because of the high synthesis of reactive oxygen species (ROS). Stress is a state of imbalance between oxidation and oxidation reactions. However, the effects of HIIT on oxidative status and muscle damage are still not well understood in the scientific literature. The objective of this dissertation was to verify the effects of short-term HIIT on biomarkers of oxidative stress and muscle damage in Wistar rats. Thus, three studies were elaborated: 1) The effects of short-term HIIT on the markers of oxidative stress and muscle damage were evaluated; 2) It was sought to characterize the responses of cardiac oxidative stress markers to HIIT in rats. 3) The effects of twelve consecutive sessions and on different days of HIIT on the markers of hepatic oxidative stress were verified. In studies 1 and 2 significant changes were found in only one marker of oxidative damage, a fact that did not happen in study 3. Still on study 1 there were no changes in the markers of muscle damage, however there was a significant reduction in a marker of defense antioxidant. In studies 2 and 3 there were no significant changes in antioxidant capacity. It is concluded that HIIT is performed on consecutive or distinct days, and depending on tissue it may or may not promote liver, heart and muscle damage in rats.

Keywords: High-intensity interval training; Oxidative stress; Muscle damage.

ÍNDICE DE FIGURAS

Estudo 1

Figura 1: Organograma do protocolo experimental.....	42
--	----

Estudo 3

Figura 1: Efeitos do HIIT sobre marcadores de estresse oxidativo (TBARS) e de danos hepáticos (AST e ALT).....	65
Figura 2: Efeitos do HIIT sobre a capacidade antioxidante.....	66

ÍNDICE DE TABELAS

Estudo 1

Tabela 1:	Efeitos do HIIT sobre marcadores de estresse oxidativos.....	43
Tabela 2:	Efeitos do HIIT sobre a atividade antioxidante.....	43
Tabela 3:	Efeitos do HIIT sobre os marcadores de danos musculares no plasma.....	43

Estudo 2

Tabela 1:	Valores dos marcadores de estresse oxidativo malondialdeído (MDA), hidroperóxidos (HPX) e proteínas carboniladas (PC).....	60
Tabela 2:	Valores da atividade antioxidante enzimática superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutariona redutase (GR) e não enzimática sulfidrilas totais (SH).....	60

Estudo 3

Tabela 1:	Protocolo experimental de adaptação.....	63
-----------	--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo geral	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. REFERÊNCIAS	5
4. DESENVOLVIMENTO	11
4.1. Estudo 1	12
4.2. Estudo 2	43
4.3. Estudo 3	60
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
6. ANEXOS	71

1. INTRODUÇÃO

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) acontece de forma contínua. Dentre elas o ânion superóxido [O₂⁻] é considerado a principal espécie reativa de oxigênio sendo formada pelo músculo esquelético em diferentes compartimentos e vias, enzimáticas e não enzimáticas, dentro da fibra muscular e, mitocôndria (1).

Para a sobrevivência e adaptação aos diferentes tipos de estresses e para que não ocorra o acúmulo de O₂⁻, as células incluindo o músculo esquelético possuem um complexo sistema de defesa antioxidante composto por enzimas antioxidantes tal como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e mediadores não enzimáticos, tal como as vitaminas C e E, retinol, bilirrubina, ácido úrico (AU), entre outros que participam da remoção e eliminação das EROs, permitindo desta forma a manutenção do balanço oxidante-redutor, chamado de estado redox (2-4).

O estresse oxidativo (EO) é a condição na qual as EROs superam a capacidade antioxidante intracelular de eliminá-las, ou seja, é um estado em que o equilíbrio entre as reações de oxidação (grau de estresse oxidativo) e reações de antioxidação (capacidade antioxidante) é interrompido, deslocando-se assim para um ambiente propício à ocorrência de reações de oxidação, e no mesmo momento sendo desfavorável ao organismo (5-6).

As EROs embora essencial para alguns processos no organismo como resposta imunitária, angiogênese e renovação de células estaminais, sua formação pode ser prejudicial para as células quando exarcebadas (7), há relatos na literatura que evidenciam lesão do DNA, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica, promovendo um aumento do estresse oxidativo (6). Inclusive, uma resposta celular a grandes danos não reparados, podem compreender apoptose ou senescência, contribuindo assim, para o surgimento de doenças (6-8). Além disto, podem oxidar os ácidos graxos nas membranas plasmáticas, comprometendo sua integridade e levando à ruptura celular (9-14), reagem com fosfolípidos e proteínas, produzindo a peroxidação lipídica, oxidação de grupos tióis e mudanças na configuração estrutural e na permeabilidade da membrana celular (15,16).

O EO está intimamente ligado à ocorrência de várias doenças como por

exemplo as cardiovasculares (17-22), a síndrome metabólica (22-24) e a obesidade (18, 22, 25-32). Outrossim, as EROs também estão associadas a respostas inflamatórias pós-exercício que podem propagar danos musculares (35,36). Entretanto, estes danos musculares e a inflamação são proporcionais ao exercício e a intensidade (37- 40).

Por outro lado, embora muito associada com benefícios à saúde, a prática regular de exercícios físicos pode ser vista como um estressor físico intenso que conduz a um aumento do estresse oxidativo, provavelmente, devido ao aumento da produção de EROs (41). No entanto, tal condição, dependerá do tipo, intensidade e duração do exercício físico proposto, ou seja, do tipo de treinamento físico (5, 34, 42). Contudo, durante o exercício físico, é comum o aumento do fluxo de oxigênio para os músculos esqueléticos, que por sua vez, favorece uma maior formação de EROs (6, 7), que podem causar danos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos celulares (33, 43). Estudos denotam que entre 2% a 5% do oxigênio que inalamos transforma-se em algum tipo de EROs (5), no entanto a forma que essa oxidação é mediada não é unicamente dependente do fluxo de oxigênio através da mitocôndria, uma vez que a absorção de oxigênio tem sido demonstrada que diferem de maneira drástica entre os modos de exercício físico durante o treinamento físico (34).

Os benefícios do treinamento com exercício físico contínuo, no que diz respeito aos biomarcadores do estresse oxidativo, já são bem descritos em outros estudos (44-47). Entre os diversos biomarcadores estão: substâncias reativas ao ácido tiobabarbítico (TBARS), hidroperóxidos (HPx), proteínas carboniladas (PC), estado total de oxidação (TOS), capacidade total antioxidante (TAC), entre outros (10,48,49).

Atualmente tem se verificado um aumento do interesse na investigação sobre o treinamento intervalado de alta intensidade, da sigla HIIT (High Intensity Interval Training), que é caracterizado por períodos de exercício vigoroso intercalados com períodos de repouso absoluto ou intervalos de baixa intensidade de recuperação ativa (50), com um acréscimo no número estudos, mas também sobre as matérias no qual este tipo de treino tem tido eficácia, além de estar sempre as principais tendências fitness mundiais do American College of Sports Medicine

(ACSM), como o último resultado que considera o HIIT como a principal para o ano de 2018 (51).

De acordo com Ramos-Filho et al. (52), o (HIIT) aplicado em seres humanos, tem sido uma forma de intervenção médica alternativa em diferentes condições de doença, tais como: insuficiência cardíaca, hipertensão, diabetes tipo II, obesidade e doença pulmonar obstrutiva crônica, como também são apresentados os benefícios em outros estudos (53-56).

Um dos modelos de HIIT é o de baixo volume que se refere a sessões de treinamento de exercícios relativamente breves incidindo num tempo menor ou igual a 10 minutos de exercício intenso em uma sessão de treino com tempo menor ou igual a 30 minutos, incluindo aquecimento, períodos de recuperação entre intervalos e arrefecimento, da maneira que se for feita uma comparação com as diretrizes tradicionais de saúde pública o exercício semanal total e o tempo de treinamento é reduzido (57).

Evidências com estudos (57-59) relativamente pequenos e de curto prazo sugerem que o HIIT pode ter uma efetividade tão grande quanto o treinamento contínuo tradicional de intensidade moderada para induzir remodelação fisiológica, que por sua vez pode estar associada a marcadores de saúde melhorados, apesar de uma redução do tempo.

Ainda que o HIIT tenha se tornado uma modalidade de treinamento popular para atletas, bem como para a população em geral, há ainda pouca informação sobre estresse oxidativo relacionado ao treinamento de curto prazo (10,60,61). Pouco se sabe dos efeitos do HIIT nos marcadores de estresse oxidativo, e ainda sobre a magnitude de alguns marcadores de danos musculares e hepáticos no exercício, tais como: creatina quinase (CK), creatinina, lactato desidrogenase (LDH), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (62,63).

Autores que avaliaram os efeitos do HIIT sobre marcadores de estresse oxidativo e danos musculares apresentam, em sua maioria, evidências em períodos intercalados entre as sessões, existindo ainda uma lacuna científica na literatura sobre os efeitos causados neste tipo de treinamento em sessões seguidas e de curto prazo.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O estudo teve como objetivo geral verificar os efeitos do treinamento intervalado de alta intensidade de curto prazo sobre os biomarcadores de estresse oxidativo e danos musculares em ratos *Wistar*.

2.2 Específicos

- Avaliar os efeitos do treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) de curto prazo em ratos sobre os marcadores de estresse oxidativo e danos musculares (Estudo 1).
- Caracterizar as respostas dos marcadores de estresse oxidativo cardíaco ao treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) em ratos (Estudo 2).
- Verificar os efeitos de doze sessões consecutivas e em dias distintos de treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) sobre os danos oxidativos hepáticos em ratos (Estudo 3).

3. REFERÊNCIAS

1. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* 2008; 88(4): 1243-76.
2. Bailey DM, Davies B, Young IS. Intermittent hypoxic training: implications for lipid peroxidation induced by acute normoxic exercise in active men. *Clin. Sci.* 2001; 101: 465-475.
3. Møller P, Loft S, Lundby C, Olsen N V. Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans. *FASEB J.* 2001; 15:1181–1186.
4. Ji, LL Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Bio Med.* 2008; 44(2): 142-152.
5. Vieira Junior, RC, Silva CMS, De Araújo MB, Garcia A, Voltarelli VA, Reis Filho A D, Voltarelli FA. Treinamento aeróbio de natação aumenta a atividade de enzimas antioxidantes e o conteúdo de glicogênio no musculoesquelético de ratos. *Rev Bras Med Esporte.* 2013; 19(3): 204-208.
6. Maruoka H, Fujii K, Inoue K, Kido S. Long-term Effect of Ubiquinol on Exercise Capacity and the Oxidative Stress Regulation System in SAMP1 Mice. *Journal of Physical Therapy Science.* 2014; 26(3): 367-371.
7. Floc'h N, Kolodziejewski J, Akkari L, et al. Modulation of Oxidative Stress by Twist Oncoproteins. Weitzman JB, ed. *PLoS ONE.* 2013; 8(8): e72490.
8. Jenni-Eiermann S, Jenni L, Smith S, Costantini D. Oxidative Stress in Endurance Flight: An Unconsidered Factor in Bird Migration. *PLoS ONE.* 2014; 9(5): e97650.
9. Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MD, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Review. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007; 39:44–84
10. Fisher G, Schwartz DD, Quindry JC, et al. Lymphocyte enzymatic antioxidant responses to oxidative stress following high-intensity interval exercise. *J Appl Physiol* 2010; 110:730–7.
11. Pellegrino MA, Desaphy JF, Brocca L, Pierno S, Camerino DC, Bottinelli R. Redox homeostasis, oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J. Physiol.* 2011; 589:2147–2160.
12. Ramos D, Martins EG, Viana-Gomes D, Casimiro-Lopes G, Salerno VP. Biomarkers of oxidative stress and tissue damage released by muscle and liver after a single bout of swimming exercise. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism.* 2013; 38(5): 507–511.

13. Parker, Lewan., Trewin, Adam., Levinger, Itamar., Shaw, Christopher S., Stepto, Nigel K. Exercise-intensity dependent alterations in plasma redox status do not reflect skeletal muscle redox-sensitive protein signaling. *Journal of Science and Medicine in Sport*. Elsevier. 2017.
14. Cipryan L. IL-6, Antioxidant Capacity and Muscle Damage Markers Following High-Intensity Interval Training Protocols. *Journal of Human Kinetics*. 2017; 56: 139-148.
15. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 2009; 29(1): 113-123.
16. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*. 2012; 19(1): 107-120.
17. Barauna V, Junior M, Costa Rosa L, Casarini D, Krieger J, Oliveira E. Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model. *Clinical And Experimental Pharmacology & Physiology*, Australia. 2005; 32(4): 249-254.
18. Schjerve IE, Tyldum GA, Tjønnå AE, Stølen T, Loennechen JP, Hansen HE, Haram PM, Heinrich G, Bye A, Najjar SM, Smith GL, Slørdahl SA, Kemi OJ & Wisløff U (2008). Both aerobic endurance and strength training programmes improve cardiovascular health in obese adults. *Clin Sci (Lond)*. 2008: 115;283–293.
19. Bond B, Cockcroft EJ, Williams CA, et al. Two weeks of high-intensity interval training improves novel but not traditional cardiovascular disease risk factors in adolescents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015; 309(6): H1039–47.
20. Gayda M, Ribeiro PA, Juneau M, Nigam A. Comparison of Different Forms of Exercise Training in Patients With Cardiac Disease: Where Does High-Intensity Interval Training Fit? *Can J Cardiol*. 2016;32(4):485-94.
21. Hussain SR, Macaluso A, Pearson SJ. High-Intensity Interval Training Versus Moderate-Intensity Continuous Training in the Prevention/Management of Cardiovascular Disease. *Cardiol Ver*. 2016; 24(6): 273-281.
22. Morales-Palomo F, Ramirez-Jimenez M, Ortega JF, Pallares JG, Mora-Rodriguez R. Cardiovascular Drift during Training for Fitness in Metabolic Syndrome Patients. *Med Sci Sports Exerc*. 2017; 49(3): 518-526.
23. Dalzill C, Nigam A, Juneau M, Guilbeault V, Latour E, Mauriège P, Gayda M. Intensive lifestyle intervention improves cardiometabolic and exercise parameters in metabolically healthy obese and metabolically unhealthy obese individuals. *Can J Cardiol*. 2014; 30(4): 434-40.
24. Steckling FM, Farinha JB, Santos DL, Bresciani G, Mortari JA, Stefanello ST, Courtes AA, Duarte T, Duarte MM, Moresco RN, Cardoso MS, Soares FA3 High Intensity Interval Training Reduces the Levels of Serum Inflammatory Cytokine on

Women with Metabolic Syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, Sep 2016; 124(10): 597-601.

25. Shiraev T, Barclay G. Evidence based exercise - clinical benefits of high intensity interval training. *Aust Fam Physician*. 2012; 41(12): 960-2.

26. Keating SE, Machan EA, O'Connor HT, Gerofi JA, Sainsbury A, Caterson ID, Johnson NA. Continuous exercise but not high intensity interval training improves fat distribution in overweight adults. *J Obes*. 2014; 2014:834-865.

27. Kuehnbaum NL, Gillen JB, Gibala MJ, Britz-McKibbin P. Personalized metabolomics for predicting glucose tolerance changes in sedentary women after high-intensity interval training. *Sci Rep*. 2014; 4:61-66.

28. Martinez N, Kilpatrick MW, Salomon K, Jung ME, Little JP. Affective and Enjoyment Responses to High-Intensity Interval Training in Overweight-to-Obese and Insufficiently Active Adults. *J Sport Exerc Psychol*. 2015; 37(2):138-49.

29. Pimenta M, Bringhenti I, Souza-Mello V, Dos Santos Mendes IK, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA. High-intensity interval training beneficial effects on body mass, blood pressure, and oxidative stress in diet-induced obesity in ovariectomized mice. *Life Sci*. 2015; 139:75-82.

30. Smith-Ryan AE, Melvin MN, Wingfield HL. High-intensity interval training: Modulating interval duration in overweight/obese men. *Phys Sportsmed*. 2015; 43(2): 107-13.

31. Denou E, Marcinko K, Surette MG, Steinberg GR, Schertzer JD. High-intensity exercise training increases the diversity and metabolic capacity of the mouse distal gut microbiota during diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016; 310(11): e982-93.

32. Dias KA, Coombes JS, Green DJ, Gomersall SR, Keating SE, Tjonna AE, Hollekim-Strand SM, Hosseini MS, Ro TB, Haram M, Huuse EM, Davies PS, Cain PA, Leong GM, Ingul CB. Effects of exercise intensity and nutrition advice on myocardial function in obese children and adolescents: a multicentre randomised controlled trial study protocol. *BMJ Open*. 2016; 6(4): e010929.

33. Juel C. Oxidative Stress (Glutathionylation) and Na,K-ATPase Activity in Rat Skeletal Muscle. Gomes AV, ed. *PLoS ONE*. 2014; 9(10): e110514.

34. Silva LA, Bom KF, Tromm CB, Rosa GL, Mariano I, Pozzi BG, Tuon T, Stresck EL, Souza CT, Pinho RA. Effect of eccentric training on mitochondrial function and oxidative stress in the skeletal muscle of rats. *Braz J Med Biol Res* 2013; 46(1): 14-20.

35. Stupka N, Lowther S, Chorneyko K, Bourgeois JM, Hogben C, Tarnopolsky MA. Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. *J Appl Physiol*. 2000; 89(6):2325-32.

36. Margonis K, Fatouros IG, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Douroudos I, Chatzinikolaou A, Mitrakou A, Mastorakos G, Papassotiriou I, Taxildaris K, Kouretas D. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43(6): 901-910.
37. Clarkson PM, Hubal ML: Exercise induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil*. 2002; 81(11): 52–69.
38. Saxton JM, Claxton D, Winter E, Pockley G: Peripheral blood leucocyte functional responses to acute eccentric exercise in humans are influenced by systemic stress, but not by exercise-induced muscle damage. *Clin Sci (Lond)*. 2003; 104:69–77.
39. Hawke TJ: Muscle stem cell and exercise training. *Exerc Sport Sci Ver*. 2005; 33:63–68.
40. Deminice R, Trindade CS, Degiovanni GC, Garlip MR, Portari GV, Teixeira M, Jordao AA. Oxidative stress biomarkers response to high intensity interval training and relation to performance in competitive swimmers. *J Sports Med Phys Fitness*. 2010; 50:356–362.
41. Poprzęcki S, Czuba M, Zając A, Karpiński J, Wilk R, Bril G, Maszczyk A, Toborek M. The blood antioxidant defence capacity during intermittent hypoxic training in elite swimmers. *Biology of Sport*. 2016; 33(4): 353-360.
42. Ballmann C, McGinnis G, Peters B, Slivka D, Cuddy J, Hailes W, Dumke C, Ruby B, Quindry J. Exercise-induced oxidative stress and hypoxic exercise recovery. *Eur J Appl Physiol*. 2014; 114:725–733.
43. Nyberg, Michael Permin; Mortensen, Stefan Peter; Cabo, Helena; Gomez-Cabrera, Mari-Carmen; Viña, Jose; Hellsten, Ylva / Roles of sedentary aging and lifelong physical activity on exchange of glutathione across exercising human skeletal muscle. In: *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 73, 2014, p. 166-173.
44. Magherini F, Gamberi T, Pietrovito L, Fiaschi T, Bini L, Esposito F, Marini M, Abruzzo PM, Gulisano M, Modesti A.. Proteomic and Carbonylation Profile Analysis of Rat Skeletal Muscles following Acute Swimming Exercise. *PLoS ONE*. 2013; 8(8): e71839.
45. Vezzoli A, Pugliese L, Marzorati M, Serpiello FR, La Torre A, Porcelli S. Time-Course Changes of Oxidative Stress Response to High-Intensity Discontinuous Training versus Moderate-Intensity Continuous Training in Masters Runners. *PLoS ONE*. 2014; 9(1): e87506.
46. Simoes K, Magosso RF, Lagoeiro CG, Castellan VT, Silva NS, Scrivante BG, Qualhato G, Figueiredo ACR, Benetti EJ, Rebelo ACS. Action of lycopene on the cardiac and skeletal muscles under oxidative stress by exercises. *Rev Bras Med Esporte*. 2014; 20(2):105-109.

47. Da Silva MF, Natali AJ, da Silva E, Gomes GJ, Teodoro BG, Cunha DN, Drummond LR, Drummond FR, Moura AG, Belfort FG, de Oliveira A, Maldonado IR, Alberici LC. Attenuation of Ca²⁺ homeostasis, oxidative stress, and mitochondrial dysfunctions in diabetic rat heart: insulin therapy or aerobic exercise? *Journal of Applied Physiology*. 2015; 119(2): 148-156.
48. McCarthy CG, Farney TM, Canale RE, Dessoulavy ME, Bloomer RJ. High-fat feeding, but not strenuous exercise, increases blood oxidative stress in trained men. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2013; 38: 33–41.
49. Wiecek M, Maciejczyk M, Szymura J, Szygula Z. Changes in Oxidative Stress and Acid-Base Balance in Men and Women Following Maximal-Intensity Physical Exercise. *Physiol. Res.* 2015; 64: 93-102.
50. Gibala MJ, McGee SL. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: a little pain for a lot of gain? *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 2008; 36(2): 58–63.
51. Thompson WR. WORLDWIDE SURVEY OF FITNESS TRENDS FOR 2018: The CREP Edition. *ACSM's Health & Fitness Journal*. 2017; 21(6): 10-19.
52. Ramos-Filho D, Chicaybam G, de-Souza-Ferreira E, Guerra Martinez C, Kurtenbach E, Casimiro-Lopes G, Galina A. High Intensity Interval Training (HIIT) Induces Specific Changes in Respiration and Electron Leakage in the Mitochondria of Different Rat Skeletal Muscles. *PLoS ONE*. 2015; 10(6): e0131766.
53. Holloway TM, Bloemberg D, da Silva ML, Simpson JA, Quadrilatero J, Spriet LL. High Intensity Interval and Endurance Training Have Opposing Effects on Markers of Heart Failure and Cardiac Remodeling in Hypertensive Rats. *PLoS ONE*. 2015; 10(3): e0121138.
54. Madsen SM, Thorup AC, Overgaard K, Jeppesen PB (2015). High Intensity Interval Training Improves Glycaemic Control and Pancreatic β Cell Function of Type 2 Diabetes Patients. *PLoS ONE*. 2015; 10(8): e0133286.
55. Moser O, Tschakert G, Mueller A, Groeschl W, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B, Koehler G, Hofmann P. Effects of High-Intensity Interval Exercise versus Moderate Continuous Exercise on Glucose Homeostasis and Hormone Response in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus Using Novel Ultra-Long-Acting Insulin. *PLoS ONE*. 2015; 10(8): e0136489.
56. Ávila LC, Bruggemann TR, Bobinski F, da Silva MD, Oliveira RC, Martins DF, Mazzardo-Martins L, Duarte MM, de Souza LF, Dafre A, Vieira RP, Santos AR, Bonorino KC, Hizume Kunzler DC. Effects of High-Intensity Swimming on Lung Inflammation and Oxidative Stress in a Murine Model of DEP-Induced Injury. *PLoS ONE*. 2015; 10(9): e0137273.

57. Gillen JB, Gibala MJ. Is high-intensity interval training a time-efficient exercise strategy to improve health and fitness? *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014; 39(3):409-12.
58. Tjønnå AE, Lee SJ, Rognmo Ø, Stølen TO, Bye A, Haram PM, Loennechen JP, Al-Shaer QY, Skogvoll E, Slørdahl SA, Kemi OJ, Najjar SM, Wisløff U. Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome - "A Pilot Study." *Circulation.* 2008;118(4):346-354.
59. Ciolac EG, Bocchi EA, Bortolotto LA, Carvalho VO, Greve JM, Guimarães GV. Effects of high-intensity aerobic interval training vs. moderate exercise on hemodynamic, metabolic and neuro-humoral abnormalities of young normotensive women at high familial risk for hypertension. *Hypertension Research.* 2010; 33: 836–843.
60. Buchheit M, Laursen PB. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle – Part II: Anaerobic energy, neuromuscular load and practical applications. *Sports Med,* 2013; 43: 927-954.
61. Tschakert G, Kroepfl J, Mueller A, Moser O, Groeschl W, Hofmann P. How to regulate the acute physiological response to "aerobic" high-intensity interval exercise. *J Sports Sci Med,* 2015; 14: 29-36.
62. Ahmetov II, Naumov VA, Donnikov AE, Maciejewska-Karłowska A, Kostyukova ES, Larin AK, Maykova EV, Alexeev DG, Fedotovskaya ON, Generozov EV, Jastrzębski Z, Zmijewski P, Kravtsova OA, Kulemin NA, Leonska-Duniec A, Martykanova DS, Ospanova EA, Pavlenko AV, Podol'skaya AA, Sawczuk M, Alimova FK, Trofimov DY, Govorun VM, Cieszczyk P. SOD2 gene polymorphism and muscle damage markers in elite athletes. *Free Radic. Res.* 2014; 48: 948-955.
63. Takeda, M, Sato, T, Hasegawa, T, Shintaku, H, Kato, H, Yamaguchi, Y, Radak, Z. The Effects of Cold Water Immersion after Rugby Training on Muscle Power and Biochemical Markers. *Journal of Sports Science & Medicine.* 2014; 13(3): 616–623.
64. Guohua C., Mary G, Ronald LP. Antioxidant Capacity in Different Tissues of Young and Old Rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1996; 211(4): 359-365.
65. Liu J, Yeo HC, Overvik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chyu DW, Brooks GA, Ames BN. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J. Appl. Physiol.* 2000; 89: 21-28.

4. DESENVOLVIMENTO

A presente dissertação aborda os efeitos do HIIT de curto prazo sobre os biomarcadores de estresse oxidativo e danos musculares em ratos Wistar. Neste sentido, foram elaborados três manuscritos, sendo que o primeiro (Estudo 1) avaliou os efeitos do HIIT de curto prazo sobre os biomarcadores de estresse oxidativo e danos musculares. No segundo manuscrito (Estudo 2) caracterizou as respostas dos biomarcadores de estresse oxidativo cardíaco ao HIIT de curto prazo em ratos. E o terceiro verificou os efeitos de 12 sessões consecutivas e em dias distintos de HIIT sobre os biomarcadores de estresse oxidativo hepático.

4.1 ESTUDO 1

(Formatação conforme normas para submissão na Revista Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism: Qualis CAPES: A1. JCR: 2.023)

Treinamento intervalado de alta intensidade de curto prazo não promove danos oxidativos e nem musculares em ratos *Wistar*.

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) de curto prazo sobre os marcadores de estresse oxidativo e danos musculares em ratos. Ratos Norvegicus da Linhagem Wistar com idade inicial de 60 dias foram divididos em 02 grupos: controle (n=08) e HIIT (n=08). O treinamento consistiu de 14 sessões de natação com duração de 20 segundos e intervalos de 10 segundos entre cada sessão, realizado durante 12 dias consecutivos (carga de 14% do peso corporal). Foi utilizado o test “t” de Student não pareado e adotada uma significância de $p < 0,05$. Nos marcadores de estresse oxidativo o HIIT promoveu uma redução (-17.75%) em relação às substâncias reativas ao ácido tiobarbitúico (TBARS) no tecido hepático ($p=0,0482$). No entanto não houve diferenças significativas para os hidroperóxidos (HPx) e proteínas carboniladas (PC) no mesmo tecido. No músculo gastrocnêmio não foram encontradas diferenças significativas em nenhum destes marcadores. Na avaliação da atividade antioxidante enzimática houve uma redução (-31.80%) do grupo HIIT em relação a enzima superóxido dismutase (SOD) no fígado ($p=0,0375$), entretanto a atividade da catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), e do conteúdo total de sulfidrilas SH) foram semelhantes entre os grupos no tecido hepático. Esses mesmos parâmetros avaliados (SOD, CAT, GPx, GR e SH) também não houveram alterações significativas no gastrocnêmio. Na avaliação dos marcadores de danos musculares creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) foram semelhantes entre os grupos no gastrocnêmio. Conclui-se que o HIIT de curto prazo não causa estresse oxidativo nem danos musculares. Palavras-chave: HIIT; Estresse oxidativo; Dano muscular.

INTRODUÇÃO

O treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) é caracterizado por períodos de exercício vigoroso intercalados com períodos de repouso absoluto ou intervalos de baixa intensidade de recuperação ativa (Gillen e Gibala, 2014; Milanović et al., 2015).

Evidências com estudos relativamente pequenos e de curto prazo sugerem que o HIIT pode ter uma efetividade tão grande quanto o treinamento contínuo tradicional de intensidade moderada para induzir remodelação fisiológica, que por sua vez pode estar associada a marcadores de saúde melhorados, apesar de uma redução do tempo (Tjønnå et al., 2008; Ciolac et al., 2010; Gillen e Gibala, 2014).

Por outro lado, embora associado a benefícios à saúde, a prática regular de exercícios físicos pode ser vista como um estressor físico intenso que conduz a um aumento do estresse oxidativo (Poprzecki et al., 2015), uma vez que há um aumento do fluxo de oxigênio para os músculos esqueléticos, que por sua vez, favorece uma maior formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Juel, 2014; Nyberg et al., 2014). No entanto, tal condição, dependerá do tipo, intensidade e duração do exercício físico proposto, ou seja, do tipo de treinamento físico (Vieira Junior et al., 2013; Ballmann et al., 2014; Parker et al., 2017).

Entende-se por estresse oxidativo (EO) um desequilíbrio entre as reações de oxidação/redução causado pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é superior a capacidade antioxidante, que favorece as reações de oxidação e, conseqüentemente, danos celulares (Powers et al., 2011; Floc'h et al., 2013; Maruoka et al., 2014; Parker et al., 2017a).

Estes eventos, cursam com aumento das respostas inflamatórias pós-exercício que podem resultar em danos musculares (Margonis et al., 2007). Entretanto, estes danos musculares e a inflamação são proporcionais à intensidade do exercício (Hawke, 2005; Deminice et al., 2013).

Autores (Deminice et al., 2010; Bogdanis et al., 2013; Pimenta et al., 2015; Songstad et al., 2015; De Araújo, 2016; Casuso et al., 2017) que avaliaram os efeitos do HIIT sobre marcadores de estresse oxidativo e danos musculares apresentam, em sua maioria, evidências em períodos intercalados entre as sessões, existindo ainda uma lacuna científica na literatura sobre os efeitos causados e da magnitude neste tipo de treinamento em sessões seguidas. Assim o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do HIIT de curto prazo sobre os marcadores de estresse oxidativo e danos musculares em ratos em sessões consecutivas.

MÉTODOS

Animais e desenho experimental

Foram utilizados 16 ratos machos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*) com idade inicial de 60 dias, e mantidos sob condições ambientais de temperatura ($24 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo acesso livre a água filtrada e ração padrão (Labina, Purina®). Os animais foram alocados aleatoriamente em dois grupos: controle sedentário (n=08) e HIIT (n=08) e mantidos em gaiolas coletivas em grupos de quatro roedores. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso Animal na mesma instituição (15/2017), e estavam

de acordo com as Diretrizes do Colégio Brasileiro de Experiências com Animais (COBEA).

Adaptação ao exercício de natação

A adaptação ao meio líquido foi realizada da seguinte forma: a temperatura da água de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Qi et al., 2014). Protocolo adaptado de Contarteze et al. (2007), num tanque cilíndrico de 80cm de profundidade x 80cm de diâmetro, nos primeiros cinco dias apenas de aclimatação à água com 10cm de água e 10 minutos dentro do tanque, e nos dez dias seguintes adaptação ao treinamento físico com sobrecarga de chumbo (pequenos sacos de tecido algodão e Velcro ®) acoplados ao tórax com sobrecargas de 0; 1 e 2% do peso corporal e duração de 10 min sendo 30 segundos de nado e intervalos de 30 segundos entre cada. A importância desta familiarização do animal ao meio líquido dá-se no sentido de adaptação ao incremento atado ao dorso e ao exercício propriamente dito sem promover possíveis alterações fisiológicas relativas ao treinamento físico (VOLTARELLI, Gobatto e Melo, 2002).

Protocolo de Exercício

O treinamento foi realizado segundo o protocolo adaptado de Terada et al. (2001), que consistiu de 14 sessões de natação com duração de 20 segundos e intervalos de 10 segundos entre cada sessão, realizado durante 12 dias seguidos, sendo a carga de 14% do peso corporal e com 60 cm de água. Após cada sessão de treinamento todos os animais foram secos, para evitar complicações fisiológicas provenientes do frio e da umidade. Estudos anteriores (Gobatto et al. 2001; Cunha 2009; De Araujo et al., 2016) identificaram que a utilização desta carga já é

considerada de alta intensidade para ratos. O desenho experimental está descrito na Figura 1.

Eutanásia e preparação dos tecidos

Após 24 horas do fim da última sessão do período experimental, os animais não estavam em estado de jejum e foram anestesiados com cetamina/xilazina (75mg/kg + 10mg/kg i.p) e o sangue (\pm 5mL) foi coletado através de punção cardíaca e então foram eutanasiados por dessangramento sob anestesia. Depois de recolhido foi imediatamente centrifugado a 800 g durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi então armazenado em eppendorf a -80° C para análises adicionais dos marcadores de danos no tecido muscular. O fígado e o músculo gastrocnêmio foram removidos e em seguida, lavados 3 vezes com solução de 1,15% de KCL (Vetec, LTDA, Rio de Janeiro, Brasil), secos e pesados para análises posteriores dos marcadores de estresse oxidativo.

Avaliação dos marcadores de danos oxidativos

Na mensuração de produtos da peroxidação lipídica através do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizado o método descrito por Bose et. al (1989), onde as amostras foram pesadas e homogeneizadas em 10 vezes o volume de solução de tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,4), contendo butil-hidroxitoluol (BHT; 12,6 mmol/L). Em seguida, 200 μ L do homogenato foram incubados a 90°C por 45 minutos com solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA 0,37%), em meio ácido (15% de ácido tricloroacético-TCA e 0,25 mol/L de ácido clorídrico). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Heal Force, Neofuge 15R) por cinco minutos a 14.000 rpm. Ao sobrenadante, acrescentou-se o n-butanol

e a solução saturada de NaCl. A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e novamente centrifugada a 14.000 rpm (Heal Force, Neofuge 15R) por dois minutos. Alíquotas do sobrenadante foram pipetadas em placas de 96 poços para a leitura da absorbância em espectrofotômetro de microplaca (Biotek, ELx800 Absorbance Microplate Reader) a 535 nm, corrigindo pelos valores de absorbância a 572 nm. A quantidade de malondialdeído (MDA) produzida foi expressa em nMol por gramas de tecido e interpretada como marcador de peroxidação lipídica formado pela reação com o ácido tiobarbitúrico.

Para determinar os danos oxidativos causados nos tecidos, foram mensurados os produtos da lipoperoxidação, através da técnica de oxidação do xilenol orange, na qual ocorre a oxidação de íons ferroso (Fe^{2+}) a íons férrico (Fe^{3+}) sob condições ácidas, pelos hidroperóxidos lipídicos (HPx) (Kuru et al., 2009).

A concentração de proteínas no tecido hepático e muscular foi determinada em triplicata pelo método de Lowry (1951). Para tanto, foram adicionados às amostras NaOH (0,5 mmol/L) e após 15 minutos adicionado Na_2CO_3 3%, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 4%, CuSO_4 2% e reagente de Folin (1:1). Em seguida, foram incubadas por 30 minutos e depois realizada leitura a 630 nm em espectrofotômetro de placa (ELx800, BIOTEK Instruments®) e por fim, foi construída uma curva padrão de albumina bovina (Sigma-Aldrich®) para aferição da concentração de proteínas nas amostras testes.

Avaliação da atividade antioxidante enzimática e não enzimática

Para a determinação da atividade do superóxido dismutase (SOD) foi utilizado o método descrito por Madesh e Balasubramanian (1998), onde as

amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão salina fosfato (PBS – 50 mmol/L, pH 7,4) e centrifugadas a 12000 rpm (Heal Force, Neofuge 15R) por 30 minutos. A reação foi realizada pipetando-se em triplicata na microplaca o sobrenadante obtido em PBS, MTT (1,25 mmol/L) e pirogalol (100 µmol/L). Em seguida, a microplaca foi agitada por 5 minutos e adicionado DMSO. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Biotek, ELx800 Absorbance Microplate Reader) a 570 nm e a atividade da SOD expressa em unidade de SOD por miligrama de proteína.

Na determinação da catalase (CAT) o protocolo foi o de Nelson e Kiesow (1972) que consistiu nas amostras homogeneizadas em PBS, em seguida, os homogenatos centrifugados (Heal Force, Neofuge 15R) a 12000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Em microplacas foram pipetados tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,0) e o sobrenadante. A reação foi iniciada com a adição de H₂O₂ (0,3 mol/L), em ambiente protegido de luz, e as medidas realizadas em espectrofotômetro (Hitachi, Japão), em intervalos de 15 segundos, a 25 °C, no comprimento de onda de 240 nm. A atividade da enzima foi expressa pela diferença da variação das absorbâncias (ΔE) /minuto/miligrama de proteínas (Nelson e Kiesow, 1972).

A atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) foi determinada de acordo com o método descrito por Paglia e Valentine (1967). Em suma, as amostras dos tecidos muscular e hepático foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (50 mmol/L), acrescido de KCL (140 mmol/L), pH 7,4 (1:10, p/v). Em seguida os homogenatos foram centrifugados (Heal Force, Neofuge 15R) a 12000 rpm por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante separado para o ensaio. Na microplaca foi colocado tampão fosfato (100 mmol/L, pH 7,0), NADPH (8,4 µmol/L), GR (10 U/mg de proteína/mL), azida sódica (NaN₃, 1,125 mol/L), GSH (0,15

mmol/L), H₂O₂ (2,2 mmol/L) e a amostra. O monitoramento foi feito a 340 nm, 25° C, por 8 minutos. A atividade da GPx foi avaliada pela oxidação do NADPH. Os resultados foram expressos em nMol/NADPH/minuto/miligrama de proteínas.

A atividade da glutathiona redutase (GR) foi determinada de acordo com o método de Carlberg e Mannervik (1985), no qual a atividade da redutase é proporcional ao consumo de NADPH monitorado a 340 nm. Em síntese, a amostra foi homogeneizada em tampão fosfato (0,2 mol/L, pH 7,5) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, 6,3 mmol/L), acrescido de Leupeptina (5 mg/mL) e fluoreto de fenilmetisulfonilo (PMSF, 100 mmol/L). O homogenato foi centrifugado por 30 minutos a 12000 rpm (Heal Force, Neofuge 15R), a 4 °C. Para o ensaio, ao homogenato foram adicionados solução de albumina (0,5 mg/mL de tampão) e GSSH (10 mmol/L). A reação foi iniciada com a adição de NADPH (1,2 mg/mL). O monitoramento foi feito a 340 nm, 37° C, por 8 minutos. O resultado foi expresso em miliunidade de GR/minuto/miligrama de proteínas.

Para as sulfidrilas totais (SH), resumidamente, os tecidos foram homogeneizados em PBS e centrifugados a 12000 rpm por 30 minutos. Em seguida, as amostras em triplicata foram incubadas com DTNB (0,3 mmol/L) durante 10 minutos e depois foram lidas em espectrofotômetro a 412 nm para posteriormente serem comparadas a uma curva padrão de cisteína (Sedlak e Lindsay, 1967).

Determinação dos marcadores de danos musculares

A quantificação do dano tecidual causado pelo HIIT foi avaliada pela medição de marcadores enzimáticos de danos nos tecidos, como a creatina quinase (CK), o lactatodesidrogenase (LDH). Para quantificação, um kit comercial (Labtest®, Lagoa

Santa, Minas Gerais, Brasil) foi usado. Soro (20 μ L) de cada animal foi homogeneizado em reagentes específicos a $37 \pm 0,2$ ° C, e as leituras foram realizadas usando um espectrofotômetro (Bioespectro Modelo SP-22 UV / Visible, Minas Gerais, Brasil) a um comprimento de onda de 340 nm.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram expressos em média \pm desvio padrão. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para avaliar a significância das diferenças entre as médias foi utilizado o teste *t* de Student para amostras não pareadas. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Para todos estes procedimentos foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, E.U.A).

Resultados

A avaliação dos marcadores de danos oxidativos nos tecidos hepático e muscular foram ilustrados na tabela 1. O TBARS teve uma redução em 17.75% no grupo HIIT em relação ao grupo controle no fígado ($p = 0,0482$), no entanto não houve diferenças significativas para os hidroperóxidos (HPx) e proteínas carboniladas (PC). No músculo gastrocnêmio não foram encontradas diferenças significativas em nenhum destes marcadores.

Para a atividade antioxidante houve uma redução (-31.80%) da SOD no tecido hepático em animais submetidos ao HIIT quando comparado ao grupo controle ($p = 0,0375$). Entretanto, não existiram na catalase (CAT), glutathione

peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), além da atividade não enzimática das sulfidrilas totais (SH). Não houveram alterações significativas na atividade antioxidante da SOD, CAT, GPx, GR e SH tecido muscular (Tabela 2). Na avaliação dos marcadores dos danos musculares CK e LDH foram semelhantes entre os grupos, portanto sem alterações expressivas (Tabela 3).

Discussão

De acordo com os resultados do presente estudo, o HIIT de curto prazo não promoveu danos oxidativos e nem musculares. Apesar de terem sido avaliados alguns marcadores bioquímicos e de lesão tecidual não foram verificadas alterações significativas em vários destes marcadores quando comparados aos efeitos gerados pelo treinamento físico.

Sabe-se que o exercício físico melhora a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante celular no sentido de uma neutralização nos aumentos de EROs, além disto que melhora o estado metabólico e a sensibilidade à insulina (Tjønnha et al., 2008; Krause et al., 2014). Mas, a intensidade do exercício necessário para produzir as mudanças mais favoráveis na homeostase redox, o equilíbrio entre EROs e antioxidantes, ainda não foi observada (Parker et al., 2014b; Bouzid et al., 2014; Vezzoli et al., 2014).

Para a avaliação de um dos indicadores de estresse oxidativo, utiliza-se a quantificação dos produtos da peroxidação lipídica através do método TBARS, que consiste na análise dos produtos finais como peróxidos lipídicos, malondialdeídos e demais aldeídos de baixo peso molecular (Powes e Jackson, 2008). No presente estudo houve uma menor produção dos malondialdeídos (MDA), corroborando com

estes achados Bogdanis et al. (2013) que confirmaram esta informação em apenas nove sessões com um volume aproximado de 2 a 3 minutos de exercício em cada sessão num estudo realizado com humanos. Contudo, no estudo de Casuso et al. (2017) para o marcador HPx também não encontraram alterações expressivas em nadadores de elite.

Nos resultados encontrados podemos ver reduções do TBARS e SOD no fígado, contrariando os achados de Songstad et al. (2015), que também investigaram os efeitos do HIIT em 15 sessões no tecido hepático de ratos, porém em corrida na esteira, e não identificaram diferenças significativas no modelo proposto.

Uma diminuição da capacidade total e aumento do nível do MDA, juntamente com um aumento da atividade do SOD são indicadores de estresse oxidativo (Burton, 2009).

Afolayan et. al. (2014), demonstraram que quando as concentrações de ATP são diminuídas e as concentrações de ADP aumentadas, a SOD não se dissocia reduzindo suas concentrações mitocondriais. Esta redução da SOD após o protocolo de HIIT foi uma resposta inesperada e este mecanismo precisa ser melhor esclarecido, contudo este fato pode ter ocorrido porque neste modelo de HIIT em natação pode ter ocorrido em algum momento por causa da hipóxia, uma vez que a limitação da disponibilidade de oxigênio pode reduzir a capacidade antioxidante (Poprzecki et al., 2016). Corroborando os resultados encontrados, Casuso et. al. (2017) em apenas 06 sessões de HIIT com modelo de natação em atletas também encontraram uma diminuição significativa da SOD em condições normais.

A concentração plasmática de PC são biomarcadores indiretos de dano protéico (Ramis et al., 2017). No presente estudo não houve aumento de PC, sugerindo deste modo que no grupo HIIT possa ter ocorrido um efeito protetor, sendo que em outros modelos de exercícios como por exemplo o futebol, a pliometria são evidenciados um aumento delas e do TBARS (Chatzinikolaou et al., 2010; Fatouros et al., 2010). No estudo de Mallard et al. (2017) que investigou os efeitos do HIIT durante 36 sessões em homens e mulheres também não encontraram diferença significativa, resultados que vem a corroborar com os resultados apresentados neste estudo mesmo com um número três vezes menor de sessões executadas.

As EROS podem ainda acometer diversos alvos celulares, tais como: DNA, proteínas, fosfolipídios de membrana e ácidos graxos poliinsaturados, favorecendo o extravasamento para o plasma de enzimas intracelulares como a CK e LDH (Nikolaidis et al 2007; Brancaccio, Lippi e Maffulli, 2010). A CK é um importante marcador indireto de dano muscular (Bogdanis et al, 2013) e no presente estudo não houveram alterações significativas deste marcador. Cyprian (2017) destaca que o efeito relacionado ao treinamento e ao dano muscular depois do HIIT ainda não foi descrito com precisão.

Dos Santos et al, 2014, que utilizaram o exercício de alta intensidade, detectaram um aumento significativo de CK causado pelo estresse mecânico pelo tipo de exercício usando uma máquina de agachamento para ratos de acordo com o modelo de Tamaki et al. (1992), fato este não ocasionado no modelo de natação adaptado de Terada et. al. (2001) e utilizado em diversos outros estudos (Terada e Tabata, 2004a; Terada, Tabata e Higuchi, 2004b; Terada et al., 2005; Fujimoto et al., 2010; Casimiro-Lopes, 2012; Ramos et al., 2013; Horii et al., 2017).

Ramos et. al. (2013), sugerem que a concentração aumentada da enzima LDH seja causadora de danos celulares. Corroborando com o presente estudo, Horii et al. (2017) que utilizou o mesmo protocolo em 24 sessões e com carga de 16% do peso corporal, não encontraram diferenças significativas no marcador LDH. Ainda sobre o estudo de Dos Santos et al. (2014), também foi constatado que não houve aumento no marcador LDH entre o grupo controle e o treinado.

De Araújo et al. (2016) também não encontraram diferenças significativas nos marcadores CK e LDH, resultados bem similares aos achados deste estudo, porém eles utilizaram um exercício de salto em meio líquido e com carga do peso corporal acoplados ao dorso do animal.

Bloomer et. al. (2007) relataram que a peroxidação lipídica, a oxidação e a inflamação das proteínas podem promover dano das células musculares e esses mecanismos podem afetar as proteínas estruturais e contractuais. Por outro lado, o sistema de defesa antioxidante pode desempenhar um papel importante atenuando as modificações oxidativas ou promovendo uma recuperação mais rápida, provocada por intenso esforço, com consequente melhoria do desempenho (Deminice et al., 2010).

Powers e Jackson (2008) destacam que a enzima CAT reduz o peróxido de hidrogênio na água, impedindo assim a produção do radical hidroxila que pode ser extremamente prejudicial aos tecidos. No presente estudo, não houve diferença estatística entre os grupos CT e HIIT. No entanto, a expressão da CAT no exercício anaeróbico é controversa (Powers e Jackson, 2008; Fisher-wellman, Bell e Bloomer, 2009). No estudo de Casuso et al. (2017), também não foram encontradas diferenças significativas.

No estudo de Mallard et al. (2017), realizado em humanos, não foram encontradas diferenças significativas na enzima GPx. Corroborando ainda Songstad et al. (2015) que também investigaram a mesma enzima em animais também não encontraram diferenças significativas, no entanto o modelo de exercício executado foi de 15 sessões no modelo em corrida na esteira.

Uma manutenção da capacidade de reparo antioxidante é uma resposta ao estresse oxidativo (Ramis et al., 2017), no entanto é evidenciado que não ocorreu um aumento da defesa antioxidante no presente estudo, uma vez que não houve alterações significativas nos tecidos hepático e muscular nos marcadores SH, CAT, GPX e GR no grupo HIIT. Importante destacar que os grupamentos sulfidrilas são estruturas associadas a proteínas sendo susceptíveis a danos oxidativos, sendo possível a quantificação e identificação do dano no tecido. No entanto, o alto nível de treinamento aumenta a capacidade do músculo esquelético para desintoxicar rapidamente a EROs produzida no músculo exercitado (Finaud et al., 2006; Brooks et al., 2008).

De Araújo et al. (2016) também não encontraram diferenças significativas na SH e nas enzimas SOD e CAT em ratos Wistar que foram submetidos a um modelo de HIIT com saltos dentro da água durante 36 sessões e também em 72 sessões.

Pimenta et al. (2015), utilizando um protocolo de HIIT semelhante ao nosso estudo, porém com aumento gradual da carga em relação a porcentagem do peso corporal e em 24 sessões, também não encontraram diferenças significativas nas enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GR. Em outro estudo em corrida na esteira, Bowen et al. (2017) em 16 sessões também não acharam alterações expressivas no SOD, CAT e GPx.

Ramos et al. (2013) sugerem que a intensidade prescrita em exercícios físicos para animais, ainda não existe um consenso sobre quais tecidos dão origem para biomarcadores oxidativos no plasma. Porém, as respostas ao treinamento em relação às enzimas antioxidantes não exerce um efeito uniforme sobre todos os antioxidantes (Antunes-Neto et al., 2013), bem como o estresse oxidativo induzido pelo exercício pode induzir respostas diferentes dependendo do tipo de tecido e da capacidade antioxidante do tecido (Balci et al., 2012).

De acordo com os resultados apresentados neste estudo podemos concluir que o HIIT de curto prazo não causou estresse oxidativo e nem danos musculares em ratos em doze sessões seguidas.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse.

Referências

Afolayan, A.J., Teng, R.J., Eis, A., Rana, U., Broniowska, KA, Corbett JA, et al. 2014. Inducible HSP70 regulates superoxide dismutase-2 and mitochondrial oxidative stress in the endothelial cells from developing lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **306**(4): 27.

Antunes Neto, J.M.F., Bergo, B.N., Thuê, C.F.O., Siviero I.M.P.S. and Padovani, R.M. 2013. Oxidative Stress and Muscle Cell Damage Biomarkers Monitoring nn

male Volleyball Athletes during a competitive season. *Brazilian Journal of Biomotricity*. **7**(4):208-218.

Balci, S.S. and Pepe, H. 2012. Effects of gender, endurance training and acute exhaustive exercise on oxidative stress in the heart and skeletal muscle of the rat. *Chin J Physiol*. **55**(4): 236-44.

Bloomer, R.J. 2007. The role of nutritional supplements in the prevention and treatment of resistance exercise-induced skeletal muscle injury. *Sports Med*. **37**:519-32.

Bogdanis, G.C., Stavrinou, P. and Fatouros, I.G. et al. 2013. Short-term high-intensity interval exercise training attenuates oxidative stress responses and improves antioxidant status in healthy humans. *Food Chem Toxicol*. **61**:171–177.

Bose, R., Sutherland, G.R. and Pinsky, C. 1989. Biological and methodological implications of prostaglandin involvement in mouse brain lipid peroxidation measurements. *Neurochemical research*. 217-220.

Bouزيد, M.A., O. Hammouda, R. Matran, et al. (2014). Low intensity aerobic exercise and oxidative stress markers in older adults. *J Aging Phys Act*. **22**(4):536-42.

Bowen, TS, Eisenkolb, S., Drobner, J., Fischer, T., Werner, S., Linke, A., et al. 2017. High-intensity interval training prevents oxidant-mediated diaphragm muscle weakness in hypertensive mice. *FASEB J.* **31**(1):60-71. doi: 10.1096/fj.201600672R

Brancaccio, P., Lippi, G. and Maffulli, N. 2010. Biochemical markers of muscular damage. *Clin Chem Lab Med.* **48**(6):757–67. doi: 10.1515/CCLM.2010.179.

Brooks, S.V., Vasilaki, A., Larkin, L.M., McArdle, A. and Jackson M.J. 2008. Repeated bouts of aerobic exercise lead to reductions in skeletal muscle free radical generation and nuclear factor kappaB activation. *J Physiol.* **586**:3979–3990.

Burton, G.J. 2009. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *Journal of Anatomy.* **215**: 27–35. doi: 10.1111/j.1469-7580.2008.00978.x PMID.

Casimiro-Lopes, G., Ramos, D., Sorenson, M.M. and Salerno, V.P. 2012. Redox balance and mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase activity in trained rats. *Eur J Appl Physiol.* **112**:3839 –3846. doi: 10.1007/s00421-012-2368-y.

Casuso, R.A., Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F.J., Aragón-Vela, J., Robles-Sanchez, C., et al. 2017. High-intensity high-volume swimming induces more robust signaling through PGC-1 α and AMPK activation than sprint interval swimming in *m. triceps brachii*. *PLOS ONE* **12**(10): e0185494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185494>.

Chatzinikolaou, A., Fatouros, I.G., Gourgoulis, V., Avloniti, A., Jamurtas, A.Z., Nikolaidis, et al. 2010. Time course of changes in performance and inflammatory responses after acute plyometric exercise. *J. Strength Cond. Res.* **24**:1389-1398.

Ciolac, E.G., Bocchi, E.A., Bortolotto, L.A., Carvalho, V.O., Greve, J.M.D. and Guimaraes, G.V. 2010. Effects of high-intensity aerobic interval training vs. moderate exercise on hemodynamic, metabolic and neuro-humoral abnormalities of Young normotensive women at high familial risk for hypertension. *Hypertens Res.* **33**(8): 836-843.

Contarteze, R.V.L., Manchado, F.B., Gobatto, C.A. and Mello, M.A.R. 2007. Biomarkers of stress in rats exercised in swimming at intensities equal and superior to the maximal estable lactate phase. *Rev Bras Med Esporte.* **13** (3):169-174.

Cunha, R. R., Cunha, V. N. R., Segundo, P. R., Moreira, S. R., Kokubun, E., Campbell, C. S. G., et al. 2009. Determination of the lactate threshold and maximal blood lactate steady state intensity in aged rats. *Cell Biochemistry and Function.* **27**(6), 351-357.

De Araujo, G.G., Papoti, M., Dos Reis, I.G.M., De Mello, M.A.R. and Gobatto CA. 2016. Short and Long Term Effects of High-Intensity Interval Training on Hormones, Metabolites, Antioxidant System, Glycogen Concentration, and Aerobic Performance Adaptations in Rats. *Frontiers in Physiology.* **7**:505. doi:10.3389/fphys.2016.00505.

Deminice, R., Rosa, F.T., Franco, G.S., and Jordao, A.A. and Freitas. E.L. 2013. Effects of creatine supplementation on oxidative stress and inflammatory markers after repeated-sprint exercise in humans. *Nutrition*. **29**:1127–1132.

Deminice, R., Trindade, C.S., Degiovanni, G.C., Garlip, M.R., Portari, G.V., Teixeira, M. and Jordao, A.A. 2010. Oxidative stress biomarkers response to high intensity interval training and relation to performance in competitive swimmers. *J Sports Med Phys Fitness*. **50**:356–362.

Dos Santos, J.L., Dantas, R.E.A., Lima, C.A., De Araújo, S.S., De Almeida, E.C., Marçal, A.C., et al. 2014. Protective effect of a hydroethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* on muscular damage and oxidative stress caused by strenuous resistance training in rats. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. **11**:58. doi:10.1186/s12970-014-0058-3.

Fatouros, I.G., Chatzinikolaou, A., Douroudos, I., Nikolaidis, M.G., Kyparos, A., Margonis, K., et al. 2010. Time-course of changes in oxidative stress and antioxidant status responses following a soccer game. *J. Strength Cond. Res*. **24**: 3278–3286.

Finaud, J., Lac, G. and Filaire E. (2006). Oxidative stress: Relationship with exercise and training. *Sports Med*. **36**:327–358

Fisher, G., Schwartz, D.D., Quindry, J., Barberio, M.D., Foster, E.B., Jones, K.W., et al. 2011. Lymphocyte enzymatic antioxidant responses to oxidative stress following high-intensity interval exercise. *J. Appl. Physiol*. **110**: 730–737.

Fisher-Wellman, K., Bell, H.K. and Bloomer, R.J. 2009a. Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms linked to exercise during cardiopulmonary and metabolic disorders. *Oxid Med Cell Longev*. **2**(1):43–51.3

Floc'h, N., Kolodziejski, J., Akkari, L., Simonin, Y., Ansieau, S., Puisieux, A., et al. 2013. Modulation of Oxidative Stress by Twist Oncoproteins. *PLoS ONE*. **8**(8): e72490. doi: 10.1371/journal.pone.0072490

Fujimoto, E., Machida, S., Higuchi, M. and Tabata, I. 2010. Effects of nonexhaustive bouts of high-intensity intermittent swimming training on GLUT-4 expression in rat skeletal muscle. *J Physiol Sci*: **60**: 95-101.

Gillen, J.B. and Gibala, M.J. 2014. Is high-intensity interval training a time-efficient exercise strategy to improve health and fitness? *Appl Physiol Nutr Metab*. **39**(3):409-12.

Gobatto, C. A., Mello, M. A. R., Sibuya, C. Y., Azevedo, J. R. M., Santos, L. A. and Kokubun, E. 2001. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology part A: Molecular and Integrative Physiology*. **130**(1), 21-27.

Hawke, T.J. 2005. Muscle stem cell and exercise training. *Exerc Sport Sci Rev*. **33**:63–68.

Horii, N., Hasegawa, N., Fujie, S., Uchida, M., Miyamoto-Mikami, E., Hashimoto, T., et al. 2017. High-intensity intermittent exercise training with chlorella intake accelerates exercise performance and muscle glycolytic and oxidative capacity in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **312**(4):520-528. doi: 10.1152/ajpregu.00383.2016

Juel, C. 2014. Oxidative Stress (Glutathionylation) and Na,K-ATPase Activity in Rat Skeletal Muscle. Gomes AV, ed. PLoS ONE. **9**(10): e110514.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry.* 265-275.

Krause, M., J. Rodrigues-Krause, C. O'Hagan, et al. 2014. The effects of aerobic exercise training at two different intensities in obesity and type 2 diabetes: implications for oxidative stress, lowgrade inflammation and nitric oxide production. *Eur J Appl Physiol.* **114**(2): p. 251-60.

Kuru, O., Senturk, U.K., Koce, G., Ozdem, S., Baskurt, O.K., Cetin, A., et al. 2009. Effect of exercise training on resistance arteries in rats with chronic nos inhibition. *J Appl Physiol.* **107**:896-902

Maruoka, H., Fujii, K. and Inoue. 2014. Long-term effect of ubiquinol on exercise capacity and the oxidative stress regulation system in SAMP1 mice. *J Phys Ther Sci.* **26**: 367–371.

Madesh, M. and Balasubramanian, K.A. 1998. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. *Indian J. Biochem. Biophys.* 84-188

Mallard, A.R., Hollekim-Strand, S.M., Coombes, J.S., Ingul, C.B. 2017. Exercise intensity, redox homeostasis and inflammation in type 2 diabetes mellitus. *J Sci Med Sport.* **20**:893–898. doi: 10.1016/j.jsams.2017.03.014

Margonis, K., Fatouros, I.G., Jamurtas, A.Z., Nikolaidis, M.G., Douroudos, I., Chatzinikolaou, A., Mitrakou, A., Mastorakos, G., Papassotiriou, I., Taxildaris, K., Kouretas, D., 2007. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free Radic. Biol.* **43**. 901–910.

Milanović, Z., Sporiš, G. and Weston, M. 2015. Effectiveness of high-intensity interval training (HIT) and continuous endurance training for VO₂max improvements: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *Sports Med.* **45**: 1469-1481

Nelson, D.P. and Kiesow, L.A. 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Analytical Biochemistry.* 474–478.

Nikolaidis, M.G., Kyparos, A., Hadziioannou, M., Panou, N., Samaras, L., Jamurtas, A.Z., et al. 2007. Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **100**(2): 235–239. doi:10. 1007/s00421-007-0423-x. PMID:17486160.

Nyberg, M.P., Mortensen, S.P., Cabo, H., Gomez-Cabrera, M.C. Viña, J. and Hellsten, Y. 2014. Roles of sedentary aging and lifelong physical activity on exchange of glutathione across exercising human skeletal muscle. In: *Free Radical Biology & Medicine*. **73**:166-173.

Parker, L., Trewin, A., Levinger, I., Shaw, C.S. and Stepto, N.K. 2017a. Exercise-intensity dependent alterations in plasma redox status do not reflect skeletal muscle redox-sensitive protein signaling. *Journal of Science and Medicine in Sport*. Elsevier. doi: 10.1016/j.jsams.2017.06.017

Paglia, D.E. and Valentine, W.N. 1967 Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. **70**:158-69.

Pimenta, M., Bringhenti, I., Souza-Mello, V., Mendes, I.K.S., Aguila, M.B., et al. 2015. High-intensity interval training beneficial effects on body mass, blood pressure, and oxidative stress in diet-induced obesity in ovariectomized mice. In *Life Sciences*. **139**. 2015:75-82.

Powers, S.K. and Jackson, M.J. 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev*. **88**: 1243–1276.

Powers, S.K., Talbert, E.E. and Adhihetty, P.J., 2011. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J. Physiol*. 589, 2129–2138.

Qi, B., Liu, L., Zhang, H., Zhou, G.-X., Wang, S., Duan, X.-Z. et al. 2014. Anti-fatigue effects of proteins isolated from panax quinquefolium. *J. Ethnopharmacol.* **153**: 430–434.

Ramos, D., Martins, E.G., Viana-Gomes, D., Casimiro-Lopes, G. and Salerno, V. P. 2013. Biomarkers of oxidative stress and tissue damage released by muscle and liver after a single bout of swimming exercise. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism.* **38**(5):507–511.

Ramis, T.Z., Medeiros, N.S., Muller, C.H.L., Boeno, F., Silveira, D., Souza, L.G., et al. 2017. Effects of Acute Exercise with Blood Flow Restriction on Oxidative Stress Biomarkers. *International Journal of Sports Science.* **7**(5): 191-195. doi: 10.5923/j.sports.20170705.03.

Righi, T., De Carvalho, C.A., Ribeiro, L.M., Da Cunha, D.N.Q., Paiva, A.C.S., Natali, A.J., et al. 2016. Alcohol consumption and the influence of physical exercise on enzyme activity of wistar rats. *Rev Bras Med Esporte.* **22**(1):40-44.

Saxton, J.M., Claxton, D., Winter, E., Pockley, G. 2003. Peripheral blood leucocyte functional responses to acute eccentric exercise in humans are influenced by systemic stress, but not by exercise-induced muscle damage. *Clin Sci (Lond).* **104**:69–77.

Sedlak, J. and Lindsay, R.H. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*. **25**:192-205.

Songstad, N.T., Kaspersen, K-H.F., Hafstad, A.D., Basnet, P., Ytrehus, K. and Acharya, G. 2015. Effects of high intensity interval training on pregnant rats, and the placenta, heart and liver of their fetuses. *PloS One*. **10**:e0143095

Tamaki, T., Uchiyama, S., Nakano, S. 1992. A weightlifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Med Sci Sports Exerc*. **24**:881–886.

Terada, S., Yokozeki, T., Kawanaka, K., Ogawa, K., Higuchi, M., Ezaki, O. and Tabata, I. 2001. Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. **90**:2019-2024.

Terada, S. and Tabata, I. (2004a). Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC 1 α protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **286**: E208–E216.

Terada S., Tabata I. and Higuchi M. 2004b. Effect of high-intensity intermittent swimming training on fatty acid oxidation enzyme activity in rat skeletal muscle. *Jpn J Physiol*. **54**: 47–52.

Terada, S., Kawanaka, K., Goto, M., Shimokawa T., Tabata I. 2005. Effects of high-intensity intermittent swimming on PGC-1 α protein expression in rat skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* **184**(1): 59-65

Tjønnå, A.E., Lee, S.J., Rognmo, Ø., Stølen, T.O., Bye, A., Haram, P.M., et al. 2008. Aerobic interval training versus continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome: A pilot study. *Circulation.* **118**(4):346-54. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.772822

Vezzoli, A., L. Pugliese, M. Marzorati, et al., 2014. Time-course changes of oxidative stress response to high-intensity discontinuous training versus moderate-intensity continuous training in masters runners. *PLoS One.* **9**(1): p. e87506.

Vieira Junior, R.C., Silva C.M.S., De Araújo, M.B., Garcia, A., Voltarelli, V.A., Reis Filho, A.D. and Voltarelli, F.A. 2013. Treinamento aeróbio de natação aumenta a atividade de enzimas antioxidantes e o conteúdo de glicogênio no musculoesquelético de ratos. *Rev Bras Med Esporte.* **19**(3): 204-208.

Voltarelli, F., Gobatto, C. and Mello, M. 2002. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* **35**: 1389-1394.

Wadley, A.J., Chen, Y.W., Lip, G.Y., Fisher, J.P. and Aldred S. 2016. Low volume-high intensity interval exercise elicits antioxidant and anti-inflammatory effects in humans. *J. Sports Sci.* **34**: 1-9

Whitfield, J.B., Heath, A.C., Madden, P.A., Pergadia, M.L., Montgomery, G.W. and Martin, N.G. 2013. Metabolic and biochemical effects of low-to-moderate alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res.* **37**(4):575-86.

Xie, Y-D., Feng, B., Gao, Y. and Wei, L. 2013. Characteristics of alcoholic liver disease and predictive factors for mortality of patients with alcoholic cirrhosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* **12**(6):594-601.

Zhen-Yue, J., James V.H. and Simon, P. W. 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein, In *Analytical Biochemistry.* **202**(2):384-389.

Figura 1. Organograma do protocolo experimental. Fonte: Os autores

Figura 1

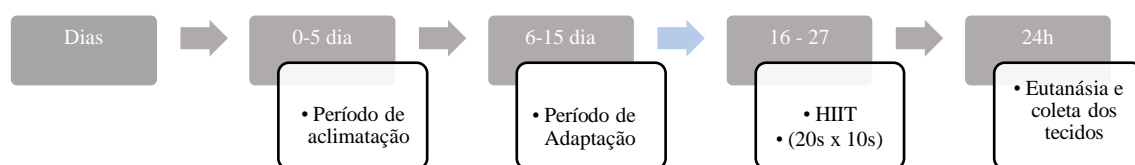


Tabela 1. Efeitos do HIIT sobre marcadores de estresse oxidativos: malondialdeído (MDA), proteínas carboniladas (PC) e hidroperóxidos (HPx).

	CT (n = 08)	HIIT (n=08)	p (value)
MDA			
Fígado	10,81 ± 0,8178	8,891 ± 0,3431*	0,0482
Músculo	7,496 ± 0,5215	6,893 ± 0,4350	0,3922
PC			
Fígado	364,7 ± 23,11	317,5 ± 16,71	0,1197
Músculo	235,2 ± 13,90	233,4 ± 11,81	0,9212
HPx			
Fígado	3,313 ± 0,3340	2,850 ± 0,2514	0,2873
Músculo	3,113 ± 0,1968	3,488 ± 0,2083	0,2117

Nota: Os dados são apresentados como média e desvio padrão. Test *t* de Student.

* Diferença significativa dentro do grupo (p <0,05).

Tabela 2. Efeitos do HIIT sobre a atividade antioxidante: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR) e sulfidrilas (SH).

	CT (n = 08)	HIIT (n=08)	p (value)
SOD			
Fígado	0,05188 ± 0,005426	0,03538 ± 0,004702*	0,0375
Músculo	0,0355 ± 0,003322	0,03725 ± 0,004078	0,7443
CAT			
Fígado	0,01571 ± 0,002514	0,0155 ± 0,002383	0,9517
Músculo	0,0215 ± 0,005207	0,01013 ± 0,002489	0,0534
GPx			
Fígado	0,2825 ± 0,01906	0,3543 ± 0,04309	0,1347
Músculo	3,829 ± 1,638	1,18 ± 0,4813	0,1684
GR			
Fígado	0,1238 ± 0,017	0,1171 ± 0,01629	0,7851
Músculo	0,2138 ± 0,02732	0,2475 ± 0,01849	0,3236
SH			
Fígado	364,7 ± 23,11	317,5 ± 16,71	0,1197
Gastrocnêmio	235,2 ± 13,90	233,4 ± 11,81	0,9212

Nota: Os dados são apresentados como média e desvio padrão. Test *t* de Student.

* Diferença significativa dentro do grupo (p <0,05).

Tabela 3. Efeitos do HIIT sobre os marcadores de danos musculares no plasma: creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH).

	CT (n = 08)	HIIT (n=08)	p (value)
CK	170 ± 35,28	194,3 ± 57,98	0,7757
LDH	64,76 ± 36,5	99,17 ± 22,5	0,4346

Nota: Os dados são apresentados como média e desvio padrão. Test *t* de Student.

4.2 ESTUDO 2

(Formatação conforme normas para submissão na Revista Motricidade. QUALIS CAPES: B1)

HIIT e estresse oxidativo cardíaco em ratos

**Respostas dos biomarcadores de estresse oxidativo cardíaco ao
treinamento intervalado de alta intensidade em ratos**

**Biomarkers responses cardiac of oxidative stress to
high intensity interval training in rats**

Artigo original

Agradecimentos: Nada declarado.

Fontes de financiamento: Nada declarado.

Respostas dos biomarcadores de estresse oxidativo cardíaco ao
treinamento intervalado de alta intensidade em ratos

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi verificar as respostas de biomarcadores de estresse oxidativo cardíaco ao treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) em ratos. Dezesesseis ratos machos da linhagem Wistar com peso inicial entre 250g e 300g foram igualmente divididos em 02 grupos com 08 animais sendo um Controle Sedentário (CT) e o outro Treinado (HIIT). O protocolo de exercício consistiu de natação de alta intensidade (14% do peso corporal; 20 segundos de atividade por 10 segundos de pausa realizado 14 vezes), o qual foi efetuado ininterruptamente por 12 dias. As concentrações de malondialdeído e de proteínas carboniladas não apresentaram alterações significativas; por outro lado, os níveis de hidroperóxidos foram maiores no grupo HIIT. As atividades de superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e os níveis de glutathione reduzida e sulfridrilas não sofreram alteração. Portanto, é sugerido que o treinamento intervalado de alta intensidade aplicado em curto prazo produza uma alteração no biomarcador de dano oxidativo hidroperóxido no tecido cardíaco.

Palavras-chaves: Treinamento Intervalado de Alta Intensidade, danos oxidativos, ratos.

Introdução

O treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT), o qual tem como características episódios breves e repetidos de atividade vigorosa (aproximadamente de 85 a 90-100% referente ao consumo máximo de oxigênio [VO₂máx]) seguidos de curtos períodos de descanso passivo ou ativo como exercícios de baixa intensidade (Haram et al., 2009; Gillen & Gibala, 2014; Songstad et al., 2015; Gillen et al., 2016). O HIIT é considerado como um método promissor para a redução dos fatores de riscos cardiometabólicos (Kessler, Sisson & Short, 2012, Evangelista et al., 2017; (Hoshino et al., 2013; Holloway et al., 2015; Evangelista et al., 2017).

O aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o exercício físico pode promover estresse oxidativo, principalmente em situações que a duração e a intensidade são desconhecidas (Bloomer, Goldfarb, Wideman, McKenzie & Consitt, 2005; Sureda et al., 2005), sendo esta última determinante para a indução deste fenômeno (Balci et al, 2012; Ballmann et al., 2014).

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade de defesa antioxidante intracelular (Powers & Jackson, 2008; Balci, Pepe, Özer & Revan, 2012; Parker et al., 2017; Silva et al., 2017). A produção e liberação exacerbadas de EROS geradas pelo exercício físico pode perturbar a homeostase redox intracelular (Rosa Lima et al., 2015), o que pode provocar danos ao DNA, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica (Jiiji, Kramer & Salermo, 2012), bem como lesões em células cardíacas (Silva et al., 2017). Como consequência, respostas celulares a danos significativos não reparados podem

provocar apoptose ou senescência, contribuindo para o surgimento de doenças cardiovasculares e a síndrome metabólica (Floc'h et al., 2013; Maruoka, Fujii, Inoue e Kido, 2014; Jenni-Eiermann, Jenni, Smith & Costantini, 2014).

Assim, o objetivo deste estudo foi verificar as respostas do HIIT sobre os biomarcadores de estresse oxidativo cardíaco em ratos. A hipótese é de que haverá um possível efeito protetor.

Métodos

Trata-se de um estudo do tipo experimental quantitativo.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso Animal na mesma instituição (15/2017), e estavam de acordo com as Diretrizes do Colégio Brasileiro de Experiências com Animais (COBEA).

Animais e Grupos Experimentais

Dezesseis ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso entre 250g e 300g e com 60 dias de idade no início do experimento foram mantidos sob condições ambientais normais de temperatura ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo acesso livre à água filtrada e ração padrão (Labina, Purina®). Os animais foram alocados aleatoriamente em dois grupos experimentais: controle sedentário (CS, n=08) e treinado (HIIT, n=08) e mantidos em gaiolas coletivas (4 animais/gaiola).

Procedimentos

Adaptação ao meio líquido

Os animais foram aclimatados e adaptados ao meio líquido à temperatura

de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Qi et al., 2014) em tanque cilíndrico de 80cm de profundidade x 80cm de diâmetro (Contarteze et al. 2007). Na primeira semana, foi realizada apenas aclimatação de 10 minutos na água à uma profundidade de 10cm; nas duas semanas subsequentes, os animais suportaram sobrecarga de chumbo (pequenas bolsas de tecido de algodão e Velcro ®) atada ao tórax durante dez dias; as sobrecargas utilizadas foram equivalentes a 0, 1 e 2% do peso corporal e cada animal foi submetido a 10 minutos de exercício de natação, sendo 30 segundos de nado e 30 segundos de repouso entre as séries totalizando 10 séries. É importante destacar que o período de adaptação não é capaz de induzir possíveis alterações fisiológicas devido às baixas intensidades utilizadas (VOLTARELLI GObatto, & Melo, 2002).

Treinamento físico

O treinamento físico foi realizado segundo o protocolo adaptado de Terada et al. (2001). Os animais, os quais suportaram sobrecargas 14% do peso corporal, esta confirmadamente de alta intensidade (Gobatto et. al. 2001; Cunha et. al. 2009; Araujo et. al. 2016) foram submetidos a 14 sessões de natação com duração de 20 segundos e intervalos de 10 segundos entre as mesmas em tanques coletivos à profundidade da água à 60 centímetros, durante 12 dias ininterruptos.

Eutanásia e preparação dos tecidos

Vinte e quatro horas após o fim da última sessão treinamento físico, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (75mg/kg + 10mg/kg i.p) seguido por eutanásia via dessangramento sob anestesia. Feito isso, o coração foi totalmente removido lavado 3 vezes com solução de cloreto de potássio (KCl)

1,15%, seco, pesado e armazenado em biofreezer à -80°C para as análises posteriores dos biomarcadores de estresse oxidativo.

Determinação dos biomarcadores de estresse oxidativo no tecido cardíaco

Os biomarcadores de dano oxidativo bem como de defesa antioxidante no tecido cardíaco dos animais foram determinados. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

Biomarcadores de Estresse Oxidativo:

Os produtos da lipoperoxidação foram mensurados de duas formas: a) concentração de hidroperóxidos lipídicos (HPx) por meio da técnica de oxidação do xilenol orange, na qual ocorre a oxidação de íon ferroso (Fe^{2+}) a íon férrico (Fe^{3+}) sob condições ácidas (Kuru et al., 2009); b) concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Bose, Sutherland & Pinsky, 1989).

A determinação da concentração de proteínas carboniladas, nos ensaios realizados, foi feita pela técnica de Lowry, Rosebrough, Farr e Randall (1951), quantificando as concentrações de proteínas nas amostras através da comparação com uma curva padrão feita com albumina do soro bovino em diversas concentrações.

Biomarcadores de defesa antioxidante:

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela capacidade da enzima tecidual em dismutar os ânions superóxidos derivados da auto-oxidação do pirogalol e pela reação destes reduzindo o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e formando os cristais de formazan (Madesh & Balasubramanian, 1998).

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pela velocidade de

degradação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) segundo protocolo padrão descrito previamente por Nelson e Kiesow (1972). A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi avaliada através da oxidação do NADPH, como descrito por Paglia & Valentine (1967). A atividade da glutathione reductase (GR) foi avaliada de acordo com o método de Carlberg & Mannervik (1985)

A determinação dos grupamentos sulfidrilas (SH) foi realizada conforme descrito por Faure & Lafond (1995), através da reação entre 5'5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB) com a sulfidrilas livre da cadeia lateral da cisteína.

Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para avaliar a significância das diferenças entre as médias foi utilizado o teste t de Student para amostras não-pareadas. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$. Para todos estes procedimentos, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Resultados

No que se refere aos biomarcadores de estresse oxidativo cardíaco (Tabela 1), houve aumento significativo somente nos níveis de HPx. Em relação à defesa antioxidante, não houve alteração em nenhum dos parâmetros avaliados entre os grupos (Tabela 2).

“inserir tabela número 1 aqui”

“inserir tabela número 2 aqui”

Discussão

O presente trabalho verificou o efeito do HIIT sobre as respostas do estresse oxidativo cardíaco de ratos. No presente estudo é fornecida evidência que sessões consecutivas de HIIT provocam uma resposta oxidativa.

Sabendo-se que o HPx é considerado um biomarcador específico e direto da peroxidação lipídica, os valores mais elevados de sua concentração no grupo HIIT, no presente estudo, evidencia que o exercício de alta intensidade e curta duração, associado a períodos curtos de recuperação, pode gerar adaptações no tecido cardíaco (Gomez-Cabrera et al., 2008; Ristow et al., 2009), tal como a remodelação estrutural da membrana celular e de suas lipoproteínas (Aldred, 2007), ambos decorrentes da situação momentânea de hipóxia induzida pelo HIIT.

Casuso et al. (2017) verificaram redução dos níveis de HPx em nadadores submetidos à hipóxia se comparados àqueles que se mantiveram em condições normais.

Estudos denotam que os efeitos cardioprotetores do exercício físico moderado a intenso podem ser atribuídos a uma inflamação vascular e um dano oxidativo (Batacan, Duncan, Dalbo, Connolly e Fenning, 2016), confirmando dados anteriores no plasma sanguíneo (Wadley, Chen, Lip, Fisher e Aldred, 2016).

No presente estudo não houve alterações significativas do MDA no tecido cardíaco em ratos, contudo Freitas et al. (2017), acharam uma redução deste marcador de lipoperoxidação, no entanto o modelo adotado no referido estudo foi o de corrida na esteira e em 36 sessões.

Rosa-Lima et al. (2015) destaca que a oxidação das proteínas pode causar a morte das células, além de que a concentração plasmática das proteínas

carboniladas são marcadores indiretos de danos protéicos (Ramis et al, 2017). No presente estudo não foram encontradas alterações expressivas das proteínas carboniladas no grupo treinado em relação ao sedentário.

Os resultados apresentados não indicaram mudanças nas concentrações plasmáticas dos grupos sulfidrilas em resposta ao HIIT, bem como na avaliação das enzimas antioxidantes não foram encontradas diferenças significativas na SOD, CAT, GPX e GR da mesma forma que no estudo de De Araújo et al. (2016) em ratos submetidos a um protocolo de alta intensidade com saltos dentro da água e resultados similares também ao presente estudo foram encontrados no estudo de Songstad et al. (2015) com um protocolo de esteira com ratos.

O presente estudo limitou-se a investigar os efeitos do HIIT sobre os marcadores de estresse oxidativo cardíaco em ratos. Uma possível limitação talvez possa ser o modelo de natação para o treinamento intervalado de alta intensidade. Sugere-se, então, que sejam aplicados outros tipos de treinamento de alta intensidade e feitas comparações entre os modelos.

Conclusões

Sugere-se que o treinamento intervalado de alta intensidade aplicado em curto prazo produz alteração no hidróperóxido que é um biomarcador de dano oxidativo.

Referências

- Aldred, S. (2007). Oxidative and nitrative changes seen in lipoproteins following exercise. *Atherosclerosis*, 192(1), 18. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.02.1
- Balci, S. S., Pepe, H. (2012). Effects of gender, endurance training and acute exhaustive exercise on oxidative stress in the heart and skeletal muscle of the rat. *Chin J Physiol*, 55(4): 236-44. doi: 10.4077/CJP.2012.BAA021
- Ballman, C., Graham M., Bridget P., D. Slivka, Cuddy J, Hailes, W.,.... Quindry J. (2014). Exercise-induced oxidative stress and hypoxic exercise recovery. *Eur J Appl Physiol*, 114:725–733.
- Batacan, R.B., Duncan, M.J., Dalbo, V.J., Connolly, K.J., Fenning, A.S. (2016). Light intensity and high intensity interval training improve cardiometabolic health in rats. *Appl Physiol Nutr Metab*, 41:945-952
- Bloomer, R. J., Goldfarb, A. H., Wideman, L., McKenzie, M.J., & Consitt, L.A. (2005). Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J. Strength Cond. Res*, 19, 276-285.
- Bond, B., Cockcroft, E.J., Williams, C.A., Harris, S., Gates, P.E., Jackman, S.R.,Barker, A.R.. (2015). Two weeks of high-intensity interval training improves novel but not traditional cardiovascular disease risk factors in adolescents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 309(6): H1039–47.
- Bose, R., Sutherland, G.R., & Pinsky, C. (1989). Biological and methodological implicationsof prostaglandin involvement in mouse brain lipid peroxidation measurements. *Neurochemical Research*, 217-220.
- Carlberg, I. & Mannervik, B. (1985). Glutathione Reductase. *Methods in Enzymology*, 113, 485-490.

- Casuso, R.A., Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F.J., Aragón-Vela, J., Robles-Sanchez, C., Nikolai, B. N.....Jesus, R.H. (2017). High-intensity high-volume swimming induces more robust signaling through PGC-1 α and AMPK activation than sprint interval swimming in m. triceps brachii. *PLOS ONE*, 12(10): e0185494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185494>
- Contarteze, R.V.L., Manchado, F.B., Gobatto, C.A., Mello, M.A.R. (2007). Biomarkers of stress in rats exercised in swimming at intensities equal and superior to the maximal estable lactate phase. *Rev Bras Med Esporte*, 13, (3):169-174.
- Cunha, RR, Cunha, VNR, Segundo, PR, Moreira, S. R., Kokubun, E., Campbell, C. S. G.,...Simões, H. G. (2009). Determination of the lactate threshold and maximal blood lactate steady state intensity in aged rats. *Cell Biochemistry and Function*, 27(6), 351-357.
- De Araujo, G.G, Papoti M, dos Reis IGM, de Mello MAR, Gobatto CA. Short and Long Term Effects of High-Intensity Interval Training on Hormones, Metabolites, Antioxidant System, Glycogen Concentration, and Aerobic Performance Adaptations in Rats. *Frontiers in Physiology*. 2016;7:505. doi:10.3389/fphys.2016.00505.
- Evangelista, AL, Evangelista, R.A.G.T., Machado, A.F., Miranda, J.M.Q., Teixeira, C.V.L.S., Lopes, C.R., & Bocalini, D.S. (2017). Effects of High-Intensity Calisthenic Training on Mood and Affective Responses. *JEPonline*, 20(6):15-23.
- Faure, P., & Lafond, J. L. (1995). Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: FAVIER, A.E.; CADET,

- J.; KALYANARAMAN, B.; FONTECAVE, M.; PIERRE, J. L. (eds.). *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Basel: Birkhäuser Verlag, 237-248.
- Floc'h, N., Kolodziejewski, J., Akkari, L., Simonin, Y., Ansieau, S., Puisieux, A.,.....Lassus, P. (2013) Modulation of Oxidative Stress by Twist Oncoproteins. *PLoS ONE* 8(8): e72490. doi:10.1371/journal.pone.0072490
- Freitas, D.A., Rocha-Vieira, E., Soares, B.A., Nonato, L.F., Fonseca, S.R., Martins, J.B.,.....Leite, H.R. (2017). High intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats. *Physiol Behav.* ,184:6-11. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.10.027
- Gayda, M., Ribeiro, P.A., Juneau, M., Nigam, A. (2016). Comparison of Different Forms of Exercise Training in Patients With Cardiac Disease: Where Does High-Intensity Interval Training Fit? *Can J Cardiol*, 32(4):485-94.
- Gillen, J.B., & Gibala, M.J. (2014). Is high-intensity interval training a time-efficient exercise strategy to improve health and fitness? *Appl Physiol Nutr Metab*, 39(3):409-12.
- Gillen, J.B., Martin, B.J., MacInnis, M.J., Skelly, L.E., Tarnopolsky, M.A., & Gibala, M.J. 2016. Twelve weeks of sprint interval training improves indices of cardiometabolic health similar to traditional endurance training despite a fivefold lower exercise volume and time commitment. *PLoS ONE*, 11: e0154075. doi:10.1371/journal.pone.0154075. PMID:27115137.
- Gobatto, C. A., Mello, M. A. R., Sibuya, C. Y., Azevedo, J. R. M., Santos, L. A., & Kokubun, E. (2001). Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology part A: Molecular and Integrative Physiology*, 130(1), 21-27.

- Gomez-Cabrera, M. C., Domenech, E., Romagnoli, M., Arduini, A., Borrás, C., Pallardo, F. V., & Viña, J. (2008). Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(1), 142–149.
- Haram, P. M., Kemi, O. J., Lee, S. J., Bendheim, M. Ø., Al -Share, Q. Y., & Waldum, H. L., (2009) .Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovascular research*, 81:723-32.
- Holloway, T. M., Bloemberg, D., da Silva, M. L., Quadrilatero, J., & Spriet, L. L. (2015). High-intensity interval and endurance training are associated with divergent skeletal muscle adaptations in a rodent model of hypertension. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 308:R927-R34.
- Hoshino, D., Yoshida, Y., Kitaoka, Y., Hatta, H., & Bonen, A. (2013). High-intensity interval training increases intrinsic rates of mitochondrial fatty acid oxidation in rat red and white skeletal muscle. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 38:326-33.
- Hussain, S.R., Macaluso, A., & Pearson, S.J. (2016). High-Intensity Interval Training Versus Moderate-Intensity Continuous Training in the Prevention/Management of Cardiovascular Disease. *Cardiol Ver*, 24(6): 273-281.
- Jenni-Eiermann, S., Jenni L., Smith, S., & Costantini D. (2014). Oxidative Stress in Endurance Flight: An Unconsidered Factor in Bird Migration. *PLoS ONE*, 9(5): e97650.

- Jiji, R.S., Kramer, C.M., & Salerno M. (2012). Non-invasive imaging and monitoring cardiotoxicity of cancer therapeutic drugs. *J Nucl Cardiol*;19:377–88.
- Kanaan, G.N., Harper, M.E. (2017). Cellular redox dysfunction in the development of cardiovascular diseases. *Biochim Biophys Acta*,1861(11 Pt A):2822–9.
- Kessler, H.S., Sisson, S.B., & Short K. (2012). The potential for high-intensity interval training to reduce cardiometabolic disease risk. *Sports Med*, 42(6):489-509. doi: 10.2165/11630910-000000000-00000
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 265-275.
- Madesh, M., & Balasubramanian, K.A. (1998). Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. *Indian J Biochem Biophys*, 35:184-8.
- Maruoka, H., Fujii, K., Inoue, K., & Kido, S. (2014). Long-term effect of ubiquinol on exercise capacity and the oxidative stress regulation system in SAMP1 mice. *J Phys Ther Sci.*, 26: 367–371.
- Morales-Palomo, F., Ramirez-Jimenez, M., Ortega, J.F., Pallares, J.G., & Mora-Rodriguez, R. (2017). Cardiovascular Drift during Training for Fitness in Metabolic Syndrome Patients. *Med Sci Sports Exerc*, 49(3): 518-526.
- Nelson, D.P., & Kiesow, L.A. (1972). Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem*, 49:474-8.
- Paglia, D.E., & Valentine, W.N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70:158-69.

- Parker, L., Trewin, A., Levinger, I., Shaw, CS, Stepto, & Nigel K. (2017). Exercise-intensity dependent alterations in plasma redox status do not reflect skeletal muscle redox-sensitive protein signaling. *Journal of Science and Medicine in Sport. Elsevier*. doi: 10.1016/j.jsams.2017.06.017
- Powers, S.K., & Jackson, M.J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.*, 88(4): 1243-76.
- Qi, B., Liu, L., Zhang, H., Zhou, G.-X., Wang, S., Duan, X.-Z.,Zhao, D.-Q. (2014) Anti-fatigue effects of proteins isolated from panax quinquefolium. *J. Ethnopharmacol*, 153: 430–434.
- Ramis, T.Z., Medeiros, N.S., Muller, C.H.L, Boeno, F., Silveira, D., Souza, LG, De Souza, MD,.... Ribeiro, JL (2017). Effects of Acute Exercise with Blood Flow Restriction on Oxidative Stress Biomarkers. *International Journal of Sports Science*, 7(5): 191-195. doi: 10.5923/j.sports.20170705.03.
- Rosa-Lima, F.L., Lannes, L., Viana-Gomes, D., Pierucci, A.P., & Salerno, V.P. (2015). Protein carbonyl levels correlate with performance in elite field hockey players. *Appl Physiol Nutr Metab*, 40(7):683-8. doi: 10.1139/apnm-2014-0456
- Ristow, M., Birringer, M., Kiehntopf, M., Zarse, K., Oberbach, A., Klo, N., & Blu, M. (2009). Antioxidants prevent healthpromoting effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(21), 8865–8670. doi:10.1073/pnas.0903485106
- Silva, F. B., Romero, W. G., Carvalho, A. L. R. A., Souza, G. A. A., Claudio, E. R. & G., Abreu, G. R. (2017). Effects of treatment with chemotherapy and/or

tamoxifen on the biomarkers of cardiac injury and oxidative stress in women with breast cancer. *Medicine*, 96(47): e8723.

Songstad, N. T., Kaspersen, K. H., Hafstad, A. D., Basnet, P., Ytrehus, K., & Acharya, G. (2015). Effects of High Intensity Interval Training on Pregnant Rats, and the Placenta, Heart and Liver of Their Fetuses. *PLoS One*, 10:e0143095.

Sureda, A., Tauler, P., Aguiló, A., Cases, N., Fuentespina, E., Córdova, A., Pons, A. (2005). Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. *Free Radic. Res.* 39: 1317-1324.

Terada, S., Yokozeki, T., Kawanaka, K., Ogawa, K., Higuchi, M., Tabata, I. (2001). Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 90:2019-2024.

Wadley, A.J., Chen, Y.W., Lip, G.Y., Fisher, J.P., & Aldred S. (2016). Low volume-high intensity interval exercise elicits antioxidant and anti-inflammatory effects in humans. *J. Sports Sci*, 34: 1-9

Voltarelli, F., Gobatto, C., & Mello, M. (2002). Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35, 1389-1394

Tabela 1

Valores dos marcadores de estresse oxidativo malondialdeído (MDA), hidroperóxidos (HPX) e proteínas carboniladas (PC).

	CE (n = 08)	TR (n=08)	p (value)
HPX	3.288 ± 0.2594	5.988 ± 0.5595	0.0006
MDA	8.386 ± 0.5837	8.694 ± 0.6250	0.072
PC	208.2 ± 10.62	217.0 ± 9.377	0.85

Nota: CE = grupo controle e TR = grupo treinado Os dados são apresentados como média e desvio padrão. Test t de Student. ($p < 0,05$).

Tabela 2

Valores da atividade antioxidante enzimática superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutariona redutase (GR) e não enzimática sulfidrilas totais (SH).

	CE (n = 08)	TR (n=08)	p (value)
SOD	0.1265 ± 0.01760	0.1661 ± 0.03506	0.33
CAT	0.02038 ± 0.003845	0.03225 ± 0.005864	0.11
GPx	0.8525 ± 0.1435	0.83 ± 0.127	0.91
GR	1.819 ± 0.632	1.378 ± 0.2635	0.53
SH	208.2 ± 10.62	217.0 ± 9.37	0.54

Nota: O treino não gerou diferenças para os parâmetros demonstrados nesta tabela. CE = grupo controle e CT = grupo treinado Os dados são apresentados como média e desvio padrão. Test t de Student. ($p < 0.05$).

HIIT e estresse oxidativo hepático

Projeto de pesquisa aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Sergipe-UFS sob o número 15/2017.

Quantidade de palavras: 3.785

Artigo Original**TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE NÃO TEM INFLUÊNCIA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO EM RATOS WISTAR****HIGH INTENSITY INTERVAL TRAINING HAS NO INFLUENCE ON HEPATIC OXIDATIVE STRESS IN WISTAR RATS**

Lúcio Marques Vieira Souza¹, Jymmys Lopes dos Santos², Bruna Pinheiro Aragão³, Anderson Carlos Marçal¹, Charles dos Santos Estevam², Elma Regina Silva de Andrade Wartha³, Felipe José Aidar Martins¹, Silvan Silva de Araújo¹

¹Programa de Pós-Graduação em Educação Física - UFS, São Cristóvão-SE, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO-UFS), São Cristóvão/SE, Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição-UFS, São Cristóvão/SE, Brasil

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de doze sessões consecutivas e não consecutivas de treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) sobre os marcadores de estresse oxidativo hepático. Trinta e dois ratos Wistar foram selecionados e divididos igualmente em quatro grupos: dois grupos controles (CS1) e (CS2), mantidos sedentários durante todo o experimento e dois grupos treinados com HIIT (CT1) e (CT2) – submetidos a um protocolo de natação de alta intensidade durante doze dias consecutivos e não consecutivos respectivamente. Em ambos os grupos submetidos ao HIIT não foram encontradas diferenças significativas no marcador de dano oxidativo (TBARS), nos marcadores da atividade antioxidante (sulfidrilas, FRAP e ácido úrico) e nos marcadores dos danos hepáticos (AST e ALT). Os resultados indicam que tanto o treinamento intervalado de alta intensidade realizado durante doze sessões consecutivas ou não consecutivas não promoveu danos oxidativos hepáticos em ratos.

Palavras-chave: Treinamento intervalado de alta intensidade, estresse oxidativo, hepático, ratos.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of twelve consecutive and non-consecutive sessions of high intensity interval training (HIIT) on markers of hepatic oxidative stress. Thirty-two Wistar rats were selected and divided equally into four groups: two control groups (CS1) and (CS2), maintained sedentary throughout the experiment and two groups trained with HIIT (CT1) and (CT2) - submitted to a protocol of high intensity swimming for twelve consecutive and non consecutive days respectively. No significant differences in the oxidative damage marker (TBARS), in the antioxidant activity markers (sulfhydryl, FRAP and uric acid) and in the markers of liver damage (AST and ALT) were found in both HIIT groups. The results indicate that both high-intensity interval training performed during twelve consecutive or non-consecutive sessions did not promote hepatic oxidative damage in rats.

Keywords: High-intensity interval training, oxidative stress, hepatic, rats

Introdução

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre o processo oxidante e antioxidante intracelular¹⁻³. Os principais agentes causadores são os radicais livres (RL) que são moléculas instáveis geradas por espécies reativas de oxigênio (EROs)^{1,3}. As EROs têm a capacidade de alterar a homeostase redox, causando o estresse oxidativo e danificando macromoléculas como lipídeos, proteínas e DNA⁴⁻⁶. Entretanto, o exercício físico aparece como o principal regulador do estado redox⁷.

Os diversos indicadores de estresse oxidativo e dano celular são medidos principalmente em amostras do plasma sanguíneo^{6,8,9,10}. Para prevenir o dano oxidativo das membranas biológicas, a produção excessiva de EROs é reduzida ou controlada por vários antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos².

Um fator conhecido é que o exercício físico pode promover estresse oxidativo, podendo resultar em danos celulares se não for neutralizado pelos mecanismos antioxidantes⁹. Atualmente tem se verificado crescente interesse na investigação sobre o treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) com acréscimo não somente no número de pesquisas científicas¹¹, além de estar sempre nas principais tendências fitness do American College of Sports Medicine (ACSM). No entanto, ainda não existe um consenso em relação ao impacto do HIIT sobre o estresse oxidativo¹.

Evidências crescentes¹²⁻¹⁵ têm mostrado que protocolos de treino HIIT promovem estímulos fisiológicos comparáveis aos do treino contínuo de endurance, apesar de um compromisso de tempo substancialmente menor e redução do volume total do exercício. Porém, os efeitos do HIIT nos marcadores de danos oxidativos hepáticos neste tipo de treinamento ainda não estão totalmente elucidados em sessões consecutivas e não consecutivas. Assim o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de doze sessões consecutivas e em dias distintos de HIIT sobre os marcadores de estresse oxidativo hepático em ratos.

Métodos

Animais

Trinta e dois ratos *Rattus Norvegicus* da Linhagem Wistar) com peso entre 250g a 300g e idade inicial entre 07 e 08 semanas. Os animais foram separados aleatoriamente e igualitariamente em 04 grupos com 08 animais cada, sendo que uma parte foi do experimento com 12 sessões seguidas: controle sedentário 1 (CS1) e treinado com HIIT (CT1) e o outro em 12 sessões, 3x por semana durante 04 semanas: controle sedentário 2 (CS2) e treinado com HIIT (CT2). Os animais ficaram mantidos em gaiolas coletivas em grupos de 04 roedores e sob condições ambientais de temperatura de 21° a 24 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas com acesso livre a água filtrada e alimentação específica para roedores (Purina®). Os procedimentos que foram utilizados neste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Sergipe (CEPA/UFS) sob o protocolo (15/2017), e estavam de acordo com as Diretrizes do Colégio Brasileiro de Experiências com Animais (COBEA).

Procedimentos

Protocolo de treinamento

Os ratos foram submetidos ao treinamento de natação adaptado de Terada et al.¹⁶, que consistiu de 14 tempos de natação com duração de 20 segundos e pausas de 10 segundos entre cada tempo, sendo a carga de 14% do peso corporal e com um nível de 60 cm de água, sendo que o CT1 realizou durante doze dias consecutivos e o grupo CT2 realizou 03x por semana durante 04 semanas. Após, cada sessão de treinamento de natação todos os animais foram secos, para evitar complicações fisiológicas provenientes do frio e da umidade. Anteriormente, uma adaptação ao meio líquido foi realizada durante 03 semanas seguindo o protocolo adaptado de Contarteze et al.¹⁷, em um tanque cilíndrico de 80cm de profundidade x 80cm de diâmetro e temperatura da água de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ com sobrecarga de chumbo (pequenos sacos de tecido algodão e Velcro®) amarrados no dorso. Antes passaram por um protocolo de adaptação nos tanques (80cm de profundidade x 80cm de diâmetro) e com diferentes níveis de água, carga, intensidade e volume, este desenho experimental está descrito na tabela 1.

GRUPOS	1ª semana (Adaptação)	2ª semana (Adaptação)	3ª semana (Adaptação)
CS1 e CS2	10 cm de água (10 minutos)	-	-
CT1 e CT2	10 cm de água (10 minutos)	50cm de água (10 minutos sendo 30 segundos de nado e intervalos de 30 segundos entre cada)	60cm de água (Sobrecargas de 0, 1 e 2% do peso corporal - duração de 10 min sendo 30 segundos de nado e intervalos de 30 segundos entre cada)

Tabela 1. Protocolo experimental de adaptação.

Fonte: Os autores

Eutanásia

Após 24 horas do fim da última sessão do período experimental (CS1 + CT1 e CS2 + CT2), os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (75mg/kg + 10mg/kg i.p) e o sangue (aproximadamente na quantidade de 5mL) foi coletado através de punção cardíaca e os animais foram eutanasiados por dessangramento sob anestesia. Imediatamente o sangue recolhido foi centrifugado a 800 g durante 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi então armazenado a -80°C . O fígado foi removido e em seguida, lavados 3 vezes com solução de 1,15% de KCL (Vetec, LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) seco e pesado. Logo após o fígado foi homogeneizado cada grama de tecido foi misturada com 5mL de KCl, 10μL de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 100mmol, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e 15μL de 10% de Triton. O homogeneizado foi então centrifugado a 3.000 g durante 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi armazenado a -80°C até análises adicionais do estresse oxidativo e marcadores de danos no tecido.

Mensuração de produtos da peroxidação lipídica através do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação da medida de TBARs foi realizada de acordo com o método descrito por Ohkawa et al.¹⁸. Quantificação de TBARS: 100 µL de homogenato de tecido hepático foram incubados em eppendorf com 350 µL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 600 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,36%), durante 1 hora a 85°C. Em seguida, os eppendorf's foram resfriados em gelo e centrifugados a 1500 RPM durante 5 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 532nm. Tetrametoxipropano (TMP) foi usado como padrão externo, e o nível de peróxidos lipídicos foi expresso em µmol de SRAT/mg de proteína, onde SRAT significa substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Determinação da capacidade antioxidante

Através da técnica FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) uma alíquota de 9 µL do plasma do fígado foi pipetada em microplaca, onde foi acrescentado 27µL de água destilada e 270µL do reagente FRAP. A placa foi incubada a 37°C durante 30 minutos e a leitura realizada a 595nm. O sulfato ferroso (FeSO 4) será utilizado como padrão e os resultados serão expressos em µM de equivalentes de sulfato ferroso produzido¹⁹.

Determinação de sulfidrilas totais (tióis)

A determinação foi realizada conforme a metodologia descrita por Faure e Lafond²⁰ em que alíquotas de 50 µL de amostra (fígado) foram misturados em 1 mL de tampão tris-EDTA, pH 8,2. Em seguida, foi realizada a primeira leitura (A) no espectrofotômetro em 412 nm. Após a leitura, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio e misturadas a 20 µL de DTNB 10 mM diluído em metanol (4 mg/ml), ficando em repouso no escuro. Ao final de 15 minutos, a segunda leitura de absorvância (A2) foi realizada. A concentração de sulfidrilas (SH) foi calculada conforme a equação: $(A2 - A1) - B \times 1,57 \text{ mM} \times 1000$ sendo o resultado expresso em nmol.mg-1 tecido.

Análises plasmáticas

Para dosagem de ácido úrico (enzimático UV uricase-peroxidase), foi utilizado o kit comercial (Labtest®, Santa Lagoa, Minas Gerais, Brasil). Plasma (20 µL) de cada animal foi homogeneizado em reagentes específicos a $37 \pm 0,2^\circ \text{C}$, e as leituras foram realizadas usando um espectrofotômetro (Biospectro Modelo SP-22 UV / Visible, Minas Gerais, Brasil) a um comprimento de onda de 540 nm.

A quantificação do dano tecidual causado pelo HIIT foi avaliada pela medição de marcadores enzimáticos de danos nos tecidos como a alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Para quantificação, um kit comercial (Labtest®, Santa Lagoa, Minas Gerais, Brasil) foi usado. Plasma (20 µL) de cada animal foi homogeneizado em reagentes específicos a $37 \pm 0,2^\circ \text{C}$, e as leituras foram realizadas usando um espectrofotômetro (Biospectro Modelo SP-22 UV / Visible, Minas Gerais, Brasil) a um comprimento de onda de 340 nm.

Análise estatística

A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para avaliar a significância das diferenças entre as médias foi utilizado o teste *t* de Student para amostras não pareadas. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Para todos estes procedimentos foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, E.U.A.).

Resultados

Os parâmetros que foram analisados estão ilustrados nas Figuras 1 e 2. Não ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) nos marcadores avaliados entre os grupos CS1 + CT1 (12 sessões seguidas) e CS2 + CT2 (12 sessões / 3x semana).

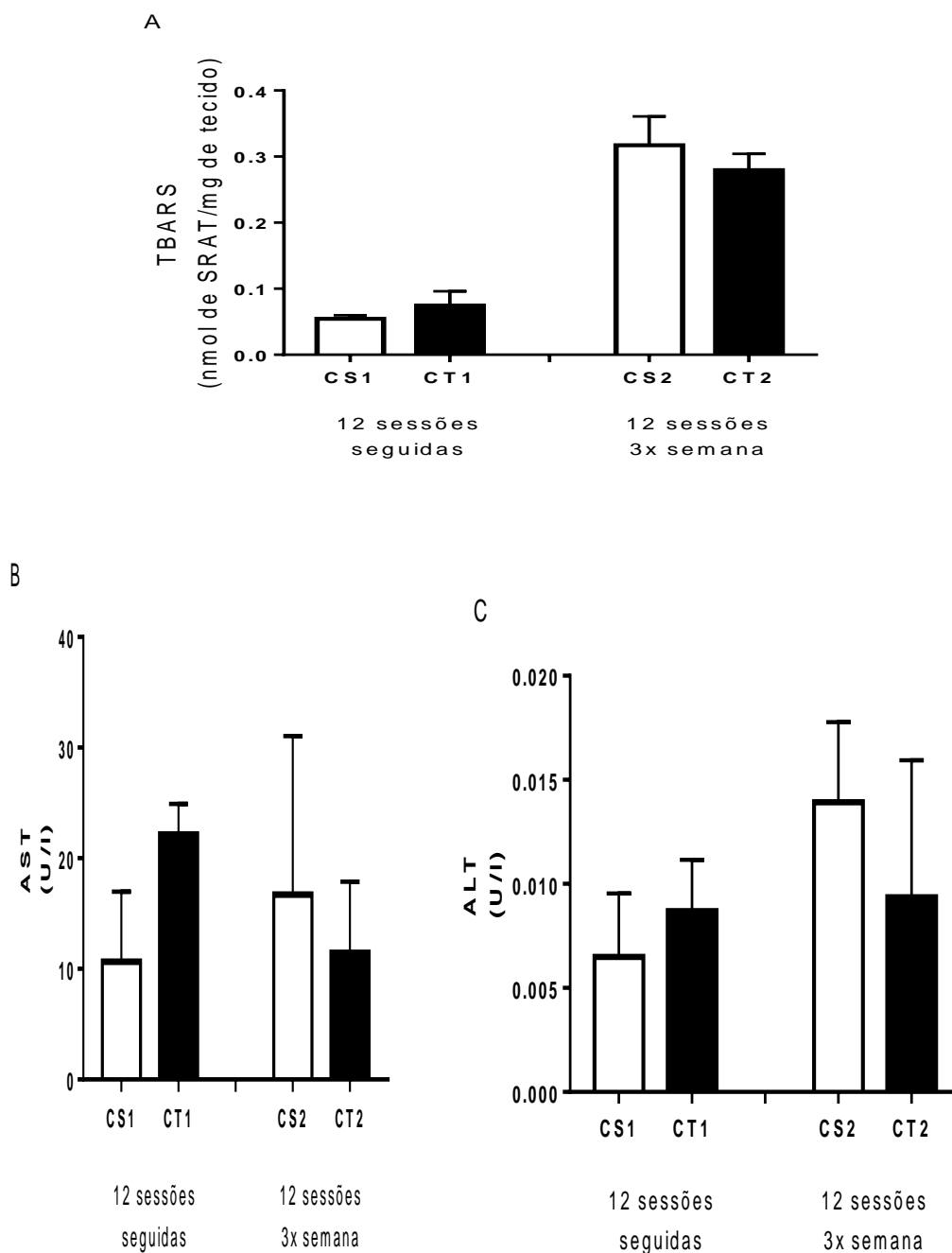


Figura 1. Efeitos do treinamento intervalado de alta intensidade sobre marcadores de estresse oxidativo (TBARS) e de danos hepáticos (AST e ALT).

Fonte: Os autores.

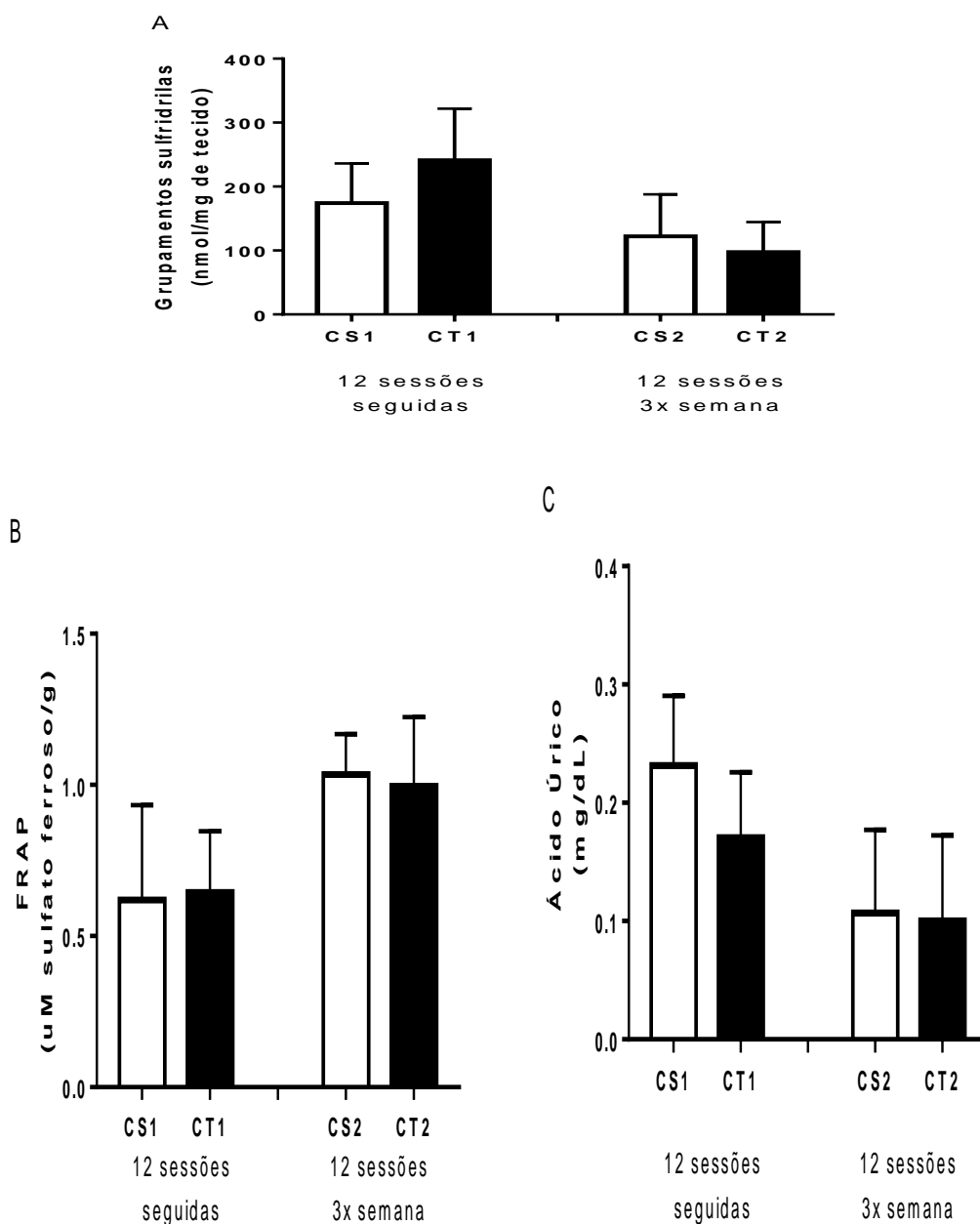


Figura 2. Efeitos do treinamento intervalado de alta intensidade sobre a capacidade antioxidante.

Fonte: Os autores.

Discussão

O principal resultado é que o HIIT em 12 dias consecutivos ou não consecutivos não promoveu danos hepáticos. A partir do método TBARS é possível detectar a presença de dano oxidativo em biomoléculas pelo grau de oxidação de lipídios²¹. Corroborando com os achados do presente estudo, Songstad et al.²² também não identificaram diferença significativa, porém o modelo foi em corrida na esteira e durante 15 sessões não consecutivas. Casimiro-Lopes et al.²³, utilizando o mesmo protocolo de Terada et al.¹⁶ e em 24 sessões também não encontraram alterações significativas. Embora, estudos anteriores

demonstrem que exercícios de alta intensidade causam mais peroxidação lipídica em comparação com exercícios de intensidade moderada ou baixa²⁴.

Para Azizbebeigi et al.²⁵ o exercício de alta intensidade na prevenção de danos causados por radicais livres, atua no sentido de fortalecimento do sistema defensivo. Neste sentido, resultados similares aos do presente estudo foram evidenciados por De Araújo et al.²⁶ que submeteram ratos a saltos dentro da água em 36 e 72 sessões e também não encontraram diferenças significativas, dando indícios de produção insignificante de espécies reativas e um estresse oxidativo reduzido.

Os danos às membranas celulares podem liberar conteúdo celular no plasma após exercício extenuante²⁷, sendo que esta condição é identificada pela liberação de enzimas intracelulares como a alanina transaminase (ALT) e o aspartato transaminase (AST)⁹, e estas são tidas como as mais importantes enzimas hepáticas²⁸. Porém, essas enzimas não tem função fisiológica conhecida no plasma e as suas quantificações poderão fornecer informações sobre a localização do tecido danificado²⁹⁻³¹.

É plenamente estabelecido que lesões hepáticas são acompanhadas por alterações na concentração de enzimas, entre essas podemos citar AST e ALT^{8,32}. Quanto mais elevado as concentrações das enzimas hepáticas, maior o risco de síndromes metabólicas³³. No presente estudo não foram encontradas diferenças significativas nos marcadores AST e ALT, dados anteriores suportam os nossos achados como os de Dos Santos³⁴ que utilizou um modelo de treinamento resistido de alta intensidade em 12 sessões durante 04 semanas, os de Motta et al.³⁵ que também usaram o protocolo de 20 segundos de exercício por 10 segundos de pausa em ratos encontraram uma diminuição significativa nos marcadores AST e ALT, porém em 36 sessões de exercício, 3 vezes por semana durante 12 semanas e com o aumento do peso corporal iniciando em 10% e terminando em 15% e no estudo de Righ et. Al.³⁶ que utilizaram o exercício de moderada intensidade e também não observaram diferenças nestes marcadores entre os grupos controle e treinado evidenciando assim a eficácia do HIIT em não gerar danos hepáticos.

A depender do tipo de exercício, os músculos acarretam extravazamento enzimático de ácido úrico e sua acumulação no plasma, sendo que o FRAP é um parâmetro de atividade antioxidante no plasma e é determinado pelo teor de ácido úrico no sangue³⁷. Visto que o aumento do ácido úrico após exercícios intensos pode explicar uma elevação da capacidade de defesa antioxidante^{38,39}, mas como podemos notar nos dados encontrados não houveram alterações significativas do ácido úrico em relação aos grupos controles, demonstrando desta forma que também não houve aumento na capacidade redutora de íons férricos (FRAP). Apesar de não observarmos diferenças significativas no sistema antioxidante do FRAP, Freitas et al.⁴⁰ que avaliaram os efeitos do HIIT em ratos com modelo de corrida em esteira durante 36 sessões não consecutivas, observaram um aumento significativo do grupo que fez HIIT em relação ao controle.

Conclusões

O treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) sendo realizado em dias consecutivos (12 sessões) ou alternados (12 sessões e 3x semana não promoveu danos hepáticos em ratos. Vale ressaltar que estes parâmetros devem ser avaliados em outros tecidos de modo a garantir maior segurança na manutenção da saúde.

Referências

1. Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*. Palo Alto. 1996; 16, 33-50.

2. Powers, S.K., Nelson, W.B., Hudson, M.B. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 51, 942–950.
3. Rosa-Lima, F.L., Lannes, L., Viana-Gomes, D., Pierucci, A.P., Salerno, V.P. (2015). Protein carbonyl levels correlate with performance in elite field hockey players. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2015;40(7):683–8. doi: 10.1139/apnm-2014-0456.
4. Pisoschi, A.M.; Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 2015, 97, 55–74.
5. Sies H., Jones D. Oxidative stress. In: Fink G., editor. 2nd ed. Vol. 3. Elsevier; Amsterdam: 2007. pp. 45–48. (Encyclopedia of Stress).
6. Wadley, A.J., Chen, Y.W., Lip, G.Y., Fisher, J.P., Aldred, S. Low volume-high intensity interval exercise elicits antioxidant and anti-inflammatory effects in humans. *J. Sports Sci.* 2016; 34:1-9.
7. Powers, S.K., Jackson, M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* 2008; 88, 1243–1276.
8. Fisher-Wellman, K., Bell HK, Bloomer RJ. Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms linked to exercise during cardiopulmonary and metabolic disorders. *Oxid Med Cell Longev.* 2009; 2(1):43–51.
9. Ramos, D., Martins, E.G., Viana-Gomes, D., Casimiro-Lopes, G., Salerno, V. P. Biomarkers of oxidative stress and tissue damage released by muscle and liver after a single bout of swimming exercise. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism.* 2013;38(5), 507–511.
10. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44–84.
11. Evangelista, A.L., Evangelista, R.A.G.T., Machado, A.F., Miranda, J.M.Q, Teixeira, C.V.L.S., Lopes, C.R., et al. Effects of High-Intensity Calisthenic Training on Mood and Affective Responses. *JEPonline.* 2017;20(6):15-23.
12. Bogdanis, G.C., Stavrinou, P., Fatouros, I.G. Short-term high-intensity interval exercise training attenuates oxidative stress responses and improves antioxidant status in healthy humans. *Food Chem Toxicol.* 2013; 61: 171–177.
13. Burgomaster, K. A., Howarth, K. R., Phillips, S. M., Rakobowchuk, M., MacDonald, M. J., McGee, S. L., et al. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *The Journal of Physiology.* 2008; 586(1), 151–160.
14. Gibala, M. J., Little, J. P., Macdonald, M. J., Hawley, J. A. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *The Journal of Physiology.* 2012; 590(Pt 5), 1077–84.
15. Gillen, J.B., Martin, B.J., MacInnis, M.J., Skelly, L.E., Tarnopolsky, M.A., and Gibala, M.J. Twelve weeks of sprint interval training improves indices of cardiometabolic health similar to traditional endurance training despite a fivefold lower exercise volume and time commitment. *PLoS ONE.* 2016; 11: e0154075. doi: 10.1371/journal.pone.0154075. PMID:27115137.

16. Terada, S., Yokozeki, T., Kawanaka, K., Ogawa, K., Higuchi, M., et al. Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. 2001; 90:2019-2024.
17. Contarteze, R.V.L., Manchado, F.B., Gobatto, C.A., Mello, M.A.R. Biomarkers of stress in rats exercised in swimming at intensities equal and superior to the maximal estable lactate phase. *Rev Bras Med Esporte*. 2007; 13, (3):169-174.
18. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 1979; 95:351–358.
19. Singhal, M.; Paul, A.; Singh, H.P. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2014;18(2):121-127.
20. Faure, P., Lafond, J. L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Favier, A.E.; Cadet, J.; Kalyanaraman, B.; Fontecave, m.; Pierre, J. L. (eds.). *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Basel: Birkhäuser Verlag, 237-248. 1995.
21. Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014; 2014:360438. doi:10.1155/2014/360438.
22. Songstad, N. T., Kaspersen, K. H., Hafstad, A. D., Basnet, P., Ytrehus, K., Acharya, G. Effects of High Intensity Interval Training on Pregnant Rats, and the Placenta, Heart and Liver of Their Fetuses. *PLoS One*. 2015; 10: e0143095.
23. Casimiro-Lopes, G., Ramos, D., Sorenson, M.M., Salerno, V.P. Redox balance and mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase activity in trained rats. *Eur J Appl Physiol*. 2012; 112:3839 –3846. doi: 10.1007/s00421-012-2368-y.
24. Balci, S. S., Pepe, H. Effects of gender, endurance training and acute exhaustive exercise on oxidative stress in the heart and skeletal muscle of the rat. *Chin J Physiol*. 2012; 55(4): 236-44. doi: 10.4077/CJP. 2012.BAA021
25. Azizbeigi, K., Stannard, S. R., Atashak, S., Haghighi, M.M. Antioxidant enzymes and oxidative stress adaptation to exercise training: comparison of endurance, resistance, and concurrent training in untrained males. *J. Exerc. Sci. Fit*. 2014;12: 1–6. doi: 10.1016/j.jesf.2013.12.001
26. De Araujo, G.G, Papoti M, dos Reis IGM, de Mello MAR, Gobatto CA. Short and Long Term Effects of High-Intensity Interval Training on Hormones, Metabolites, Antioxidant System, Glycogen Concentration, and Aerobic Performance Adaptations in Rats. *Frontiers in Physiology*. 2016; 7:505. doi:10.3389/fphys.2016.00505.
27. Kalafati, M., Jamurtas, A.Z., Nikolaidis, M.G., Paschalis, V., Theodorou, A.A., Sakellariou, G.K., et al. Ergogenic and antioxidant effects of spirulina supplementation in humans. *Med. Sci. Sports Exerc*. 2010; 42(1): 142–151. doi:10. 1249/MSS.0b013e3181ac7a45. PMID:20010119.
28. Altinoz, E., Ozmen, T., Oner, Z., Elbe, H., Erdemli, ME., Bag, H.G. Effect of crocin on oxidative stress in recovery from single bout of swimming exercise in rats. *Gen Physiol Biophys*. 2016; 35(1): 87-94. doi: 10.4149/gpb_2015018.

29. Chen, T.C., Hsieh, S.S. Effects of a 7-day eccentric training period on muscle damage and inflammation. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33(10):1732-8.
30. Skenderi, K.P., Kavouras, S.A., Anastasiou, C.A., Yiannakouris, N., Matalas, A.L. Exertional Rhabdomyolysis during a 246-km continuous running race. *Med Sci Sports Exerc.* 2006; 38: 1054–1057.
31. Skenderi, K.P., Tsironi, M., Lazaropoulou, C., Anastasiou, C.A., Matalas, A.L., Kanavaki, I., Thalmann, M., Goussetis, E., Papassotiriou, I., Chrousos, G.P. Changes in free radical generation and antioxidant capacity during ultramarathon foot race. *Eur J Clin Invest.* 2008; 38:159–165
32. Xie, C., Li, L., Xu, Y.P., Zhu, Y.Y., Jiang, J.J. Anti-fibrosis effects of fenofibrate in mice with hepatic fibrosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2013 Dec;21(12):914-9. doi: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2013.12.008..
33. Whitfield, J.B., Heath, A.C., Madden, P.A., Pergadia, M.L., Montgomery, G.W., Martin, N.G. Metabolic and biochemical effects of low-to-moderate alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res.* 2013;37(4):575-86.
34. Dos Santos, J.L., Dantas, R.E.A, Lima, C.A, et al. Protective effect of a hydroethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* on muscular damage and oxidative stress caused by strenuous resistance training in rats. *Journal of the International Society of Sports Nutrition.* 2014; 11:58. doi:10.1186/s12970-014-0058-3.
35. Motta, V. F.; Aguila, M. B. & Mandarim-De-Lacerda, C. A. Highintensity interval training (swimming) significantly improves the adverse metabolism and comorbidities in diet-induced obese mice. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* 2015.
36. Righi, T. De Carvalho, C.A., Ribeiro, L.M., Da Cunha, D.N.Q., Paiva, A.C.S., Natali, A.J., Pereira, E.T., Lima, L.M. Alcohol consumption and the influence of physical exercise on enzyme activity of wistar rats. *Rev Bras Med Esporte.* 2016;22(1):40-44.
37. Balogh, N. Biochemical and antioxidant changes in plasma and erythrocytes of pentathlon horses before and after exercise. *Vet Clin Pathol.* 2001; 30:214–218.
38. Baker, J.S, Bailey, D.M., Hullin, D., Young, I., Davies, B. Metabolic implications of resistive force selection for oxidative stress and markers of muscle damage during 30 s of high-intensity exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2004, 92 (3): 321-327.
39. Chatzinikolaou, A., Fatouros, I.G., Gourgoulis, V., Avloniti, A., Jamurtas, A.Z., Nikolaidis, M.G., Douroudos, I., Michailidis, Y., Beneka, A., Malliou, P., Tofas, T., Georgiadis, I., Mandalidis, D., Taxildaris, K. Time course of changes in performance and inflammatory responses after acute plyometric exercise. *J. Strength Cond. Res.* 2010; 24: 1389–1398.
40. Freitas, D.A., Rocha-Vieira, E., Soares, B.A., Nonato, L.F., Fonseca, S.R., et al. High intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats. *Physiol Behav.* 2017; 184:6-11. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.10.027.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que o HIIT sendo uma das principais modalidades recomendadas no mundo, necessita de dados que suportem os pesquisadores e praticantes deste método para uma execução e planejamento com maior segurança nas diversas variáveis do treinamento. Esta dissertação ajuda a esclarecer sobre os danos oxidativos e musculares que possam ser causados por este tipo de treinamento. Portanto, os achados indicaram que o HIIT, seja realizado em dias consecutivos ou distintos, e a depender do tecido pode ou não promover danos hepáticos, cardíacos e musculares em ratos.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
 PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
 COORDENAÇÃO DE PESQUISA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do treinamento intervalado de alta intensidade de curto prazo sobre os biomarcadores de estresse oxidativo e lesão muscular em ratos Wistar", registrada com o nº 15/2017, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de 26/09/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01/11/2017, Término: 28/02/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Heterogênico Wistar
Nº de animais	30
Peso/idade	250g / 60 dias
Sexo	M
Origem	Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS)

Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA
 Coordenador do CEPA/UFS